

## Tesis de Posgrado

# Anticuerpos monoclonales contra adenilato ciclasa de eucariotes inferiores

Torruella, Mónica

1984

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Torruella, Mónica. (1984). Anticuerpos monoclonales contra adenilato ciclasa de eucariotes inferiores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1837\\_Torruella.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1837_Torruella.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Torruella, Mónica. "Anticuerpos monoclonales contra adenilato ciclasa de eucariotes inferiores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1837\\_Torruella.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1837_Torruella.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ADENILATO CICLASA  
DE EUCARIOTES INFERIORES

AUTOR: Mónica Torruella

DIRECTOR: Prof.Dr. Héctor Norberto Torres

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar".  
Instituto de Investigaciones en Ingeniería  
Génética y Biología Molecular

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1984 -

1837  
5.2

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro contribuyeron al logro de esta tesis.

Al Dr. Héctor N. Torres, por sus enseñanzas, constante estímulo y apoyo permanente.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por su guía constante y generosa transmisión de conocimientos, sin cuya colaboración muchos de los experimentos de este trabajo no hubieran sido posibles.

Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo de la Fundación Campomar, por haber permitido llevar a cabo esta tesis en el Instituto.

Al Dr. Juan J. Cazzulo, por haber despertado en mí la vocación científica e inculcado una actitud abierta en este campo.

A la Dra. Elsa L. Segura, Directora del Instituto "Fátala Chabén", por haberme facilitado el material necesario para desarrollar los experimentos.

Al Dr. Ernesto Podestá, por haberme iniciado en los secretos de la metodología de anticuerpos monoclonales.

A la Dra. Alcira Battle, Consejera de Estudios, por la orientación que me brindó.

A la Dra. María Teresa Téllez de Iñón y al Dr. Norberto Judewicz, quienes me alentaron constantemente con sus consejos y amistad.

Al Dr. Alberto R. Kornblihtt y al Dr. Juan A. Reig por haberme estimulado en mis primeros experimentos.

A mis compañeros y amigos, Luis Molina y Vedia, Clara Rubinstein, Ricardo Attar y Claudio Eisenschlos, que permitieron que muchos de los experimentos presentados se desarrollaron con éxito.

A Mary B. de Iazzolino y Beile Wolf, por la ayuda brindada desde el área administrativa.

A Margarita Mazzardi, Soledad de Gimenez y Francisco Irusta, por la esmerada asistencia técnica proporcionada.

A Liliana Goicochea de Botana, por su paciente y cuidadosa labor mecanográfica.

A Norberto Malarini, por su dedicación en la confección de gráficos.

A mis amigas Marcela Ferrer y Marcela Salvarrey, por sus buenos consejos.

A todos los amigos del I.I.B. y del I.N.G.E.B.I., que me brindaron ayuda y compañía en estos años.

## CAPITULO I. INTRODUCCION.

I. Consideraciones Generales	1.
II. Adenil Ciclasa	5.
II-1. Distribución y Localización	6.
II-2. Componentes proteicos del sistema adenil ciclasa hormono-sensible	7.
II-2.1. Componente catalítico	9.
II-2.2. Componente regulatorio	10.
II-2.3. Receptor hormonal	12.
II-3. Regulación GTP	12.
II-4. Activación por toxina del cólera	15.
II-5. Efecto de la toxina de Bordetella pertussis	16.
II-6. Efecto del ión fluoruro	17.
II-7. Efecto de calmodulina	18.
II-8. Regulación por hormonas	21.
III. Modelo de interacción molecular entre los componentes proteicos del sistema de la adenil ciclasa en células superiores.	27.
IV. Rol del AMP cíclico en eucariotes superiores	30.
IV-1. Quinasas de proteínas	32.
IV-2. Fosfatasas de fosfoproteínas	36.
V-1. Adenil Ciclasa en Bacterias	38.
V-2. Adenil Ciclasa en protistas	40.
V-2.1. Protozoarios	
- <u>Paramecium tetraurelia</u>	40.
- <u>Tetrahymena piriformis</u>	41.

V-2.2.	<u>Mucor</u>	41.
V-2.3.	<u>Saccharomyces</u>	42.
V-2.4.	<u>Blastodiella</u>	43.
VI.	<u>Neurospora Crassa</u>	
VI-1.	Ciclo de Vida	44.
VI-2.	Requerimientos nutricionales	46.
VI-3.	Adenil Ciclasa	46.
VI-4.	Quinasas de proteínas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos	47.
VI-5.	Diferenciación y mutantes	48.
VII.	<u>Trypanosoma cruzi</u>	49.
VII-1.	Requerimientos nutricionales	53.
VII-2.	Adenil Ciclasa	53.
VII-3.	Quinasas de proteínas y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos	53.
VIII.	Respuesta inmune	54.
VIII-1.	Anticuerpos policlonales	55.
VIII-2.	Anticuerpos monoclonales	56.
<u>CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS</u>		
I.	<u>Neurospora Crassa</u>	
I-1.	Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	66.
I-2.	Homogeneización y Fraccionamiento	66.

II.	<u>Trypanosoma Cruzii</u>	
II-1.	Cepa utilizada y condiciones de cultivo	67.
II-2.	Homogeneización y Fraccionamiento	68.
III.	Preparación del sustrato radioactivo de la adenil ciclasa [ $\alpha$ <sup>32</sup> P]ATP.	69.
IV.	Ensayo de la Actividad de Adenil Ciclasa	74.
V.	Preparación de Hexilamino-sefarosa	75.
VI.	Solubilización de la Adenil Ciclasa de <u>T.cruzi</u>	76.
VII.	Purificación parcial de la Adenil Ciclasa de <u>T.cruzi</u>	77.
VII-1.	Cromatografía en Hexilamino-sefarosa	77.
VII-2.	Enfoque isoelectrico en columna	77.
VIII.	Caracterización molecular de la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	79.
VIII-1.	Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	79.
VIII-2.	Filtración en geles de agarosa	79.
VIII-3.	Determinación de las proteínas marcadoras en los gra- dientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel.	80.
IX.	Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos	80.
IX-1.	Volumen específico parcial	80.
IX-2.	Radio de Stokes	83.
IX-3.	Peso molecular	83.
IX-4.	Coefficiente friccional	83.
IX-5.	Parámetros de las proteínas marcadoras	84.

X.	Purificación parcial de la Adenil Ciclasa de <u>N.crassa</u>	85.
X-1.	Cromatografía en Hexilamino-sefarosa	85.
X-2.	Filtración de gel de agarosa	85.
XI.	Flectroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes	86.
XII.	Preparación de adenil ciclasa soluble de testículo de rata	87.
XIII.	Preparación de membranas de hígado de rata	88.
XIII-1.	Tratamiento de N-etil maleimida	89.
XIII-2.	Tratamiento con toxina del cólera	89.
XIV.	Preparación de membranas de eritrocito de pavo	90.
XIV-1.	Tratamiento con toxina del cólera	90.
XIV-2.	Tratamiento con detergentes	90.
XIV-3.	Cromatografía en Ultroge1	91.
XIV-4.	Ensayo de unión (Binding) del [ <sup>3</sup> H]dihidroalprenolol a receptores	92.
XIV-5.	Ensayo de unión del [I <sup>125</sup> ]glucagón a receptores	93.
XV.	Procedimiento para la reconstitución de la adenil ciclasa empleando componentes de diferentes sistemas biológicos	93.
XVI.	Procedimiento para la fusión de membranas de diferentes orígenes biológicos para la obtención de una actividad de adenil ciclasa	93.
XVII.	Obtención de anticuerpos monoclonales para las adenil ciclasas de <u>N.crassa</u> y <u>T.cruzi</u>	95.



XVII-1.	Esquema de inmunización	95.
XVII-2.	Procedimiento de fusión	97.
XVII-3.	Cultivo y selección	99.
XVII-4.	Congelamiento de los híbridos	99.
XVII-5.	Determinación de inmunoglobulinas en el medio condicionado por los híbridos	100.
XVII-6.	Determinación de anticuerpos específicos para la adenil ciclasa	101.
XVII-7.	Purificación de los anticuerpos	
XVII-7.1.	Precipitación con sulfato de amonio	103.
XVII-7.2.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	103.
XVII-8.	Caracterización de los anticuerpos por inmuno-electroforesis.	103.
XVII-8.1.	Dispositivo experimental	104.
XVII-8.2.	Preparación de las placas de agarosa y electroforesis	104.
XVII-8.3.	Inmunodifusión	105.
XVII-8.4.	Coloración de las placas	105.
XVII-9.	Electrotransferencia de adenil ciclasa e inmunoprecipitación "in situ" con anticuerpos específicos	105.
XVIII.	Preparación de anticuerpo-sefarosa	108.
XIX.	Purificación por inmuno-afinidad de la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	108.
XX.	Otras determinaciones realizadas	108.

## CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.

I. Adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	
I-1. Localización celular	110.
I-1.1. Tratamiento con detergentes	111.
I-1.2. Tratamiento con enzimas lipolíticas	113.
I-1.3. Tratamientos mecánicos	113.
I-1.4. Tratamientos con sales	114.
I-1.5. Tratamientos con detergentes y sales	115.
II. Purificación parcial de la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	
II-1. Cromatografía en Hexilamino-sefarosa	116.
II-2. Enfoque isoelectrico en gradientes de sacarosa	118.
II-3. Discusión	118.
III. Caracterización molecular de la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	
III-1. Filtración en gel	120.
III-2. Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa	120.
III-3. Discusión	122.
IV. Purificación parcial de la adenil ciclasa de <u>N.crassa</u>	
IV-1. Solubilización	126.
IV-2. Cromatografía en Hexilamino-sefarosa	126.
IV-3. Filtración en gel	126.
IV-4. Discusión	128.
V. Experimentos de la reconstitución del sistema adenil ciclasa sensible a hormona con la enzima de <u>N.crassa</u> del componente regulatorio de eritrocito de pavo	128.
V-1. Actividad de adenil ciclasa en preparaciones de <u>N.crassa</u> y eritrocito	129.

V-2.	Requerimientos para la obtención de un sistema reconstituido	131.
V-3.	Variación de la actividad enzimática en el sistema reconstituido en presencia de diversos efectores	133.
V-4.	Variación de la actividad enzimática del sistema reconstituido por las diferentes concentraciones de extracto en colato utilizados en el ensayo	133.
V-5.	Efecto del isoproterenol y el fluoruro en el sistema reconstituido en presencia de Gpp(NH)p	135.
V-6.	Reconstitución de la actividad de adenil ciclasa dependiente de Mg <sup>2+</sup> en membranas de <u>N.crassa</u> utilizando extractos de membrana de eritrocito pretratadas con toxina del cólera y [ <sup>14</sup> C] NAD	140.
V-7.	Discusión	140.
VI.	Experimentos de fusión entre membranas de <u>T.cruzi</u> y componente regulatorio de membranas de hígado de rata	143.
VI-1.	Actividad de adenil ciclasa en preparaciones de <u>T.cruzi</u> e hígado de rata	144.
VI-2.	Variación de la actividad enzimática en las membranas utilizadas y en el sistema reconstituido, en presencia de diversos efectores	148.
VI-3.	Efectos del ión fluoruro en el sistema originado por fusión	152.
VI-4.	Efecto del glucagón en el sistema originado por fusión en presencia de Gpp(NH)p	152.
VI-5.	Discusión	152.
VII.	Anticuerpos monoclonales para adenil ciclasa de <u>N.crassa</u>	155.
VII-1.	Discusión	162.
VIII.	Anticuerpos monoclonales para la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u>	165.
VIII-1.	Purificación de la adenil ciclasa de <u>T.cruzi</u> por inmunoafinidad	169.
VIII-2.	Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida	174.
VIII-3.	Electrotransferencia de adenil ciclasa e inmunoprecipitación "in situ" con anticuerpos específicos	174.

VIII-4. <u>Discusión</u>	177.
<u>CAPITULO IV. CONCLUSIONES</u>	182.
<u>CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA</u>	185.
<u>ABREVIATURAS</u>	197.

I N T R O D U C C I O N

## INTRODUCCION

### I. CONSIDERACIONES GENERALES

Los organismos deben adaptarse constantemente a cambios del medio ambiente. Esto involucra reajustes en funciones especializadas de parte de cada una de las células.

Las hormonas pueden ser consideradas como mensajeros químicos, liberados en respuesta a cambios del medio, representados éstos, por estímulos químicos o neurogénicos.

Las moléculas de los mensajeros hormonales interactúan con las células blanco y modulan así sus funciones. La mayor parte de las hormonas no requerirían penetrar al interior de las células para ejercer sus efectos. Para ello, luego de interactuar con estructuras específicas en el exterior de la membrana plasmática, provocan la generación de una señal, segundo mensajero o mensajero intracelular que determina un cambio en las funciones de las células.

Se han identificado dos mensajeros intracelulares en forma de nucleótidos cíclicos, 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico) (1) y 3'-5' guanosina monofosfato cíclico (GMP cíclico) (2). Estos dos compuestos, químicamente similares pero fisiológicamente bastante diferentes, están implicados en una variedad de procesos mediados por hormonas y también en cambios no inducidos hormonalmente.

En 1957, Sutherland y Rall (3) (4), estudiaron la acción de hormonas glucogenolíticas como el glucagón y la epinefrina y observaron que ambas determinaban una activación de la fosforilasa hepática (5). Esta activación, claramente involucraba intermediarios en la membrana celular, pues la enzima no podía ser activada en preparaciones libre de membranas. Sin embargo, si las hormonas eran agregadas a un preparado rico en membranas, y la mezcla se adicionaba al sobrenadante libre de

ellas, la activación ocurría. Estos experimentos demostraron que la activación implicaba la existencia de una sustancia termoestable sintetizada por las membranas. Este compuesto fué identificado como la 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (figura 1) o AMP cíclico.

En una serie de experimentos ulteriores, Sutherland analizó la acción del glucagón y el AMPc y estableció una serie de criterios por los cuales se puede asegurar que el nucleótido posee un papel como mediador de la acción hormonal en distintos sistemas. Primero, demostró que el glucagón aumenta los niveles de AMPc en células de hígado. Segundo, que el AMPc es formado por la membrana plasmática a través de la acción de acción de la enzima denominada adenil ciclase (6) y la hormona puede activar a esta enzima; tercero la adición de AMPc a preparaciones de hígado imita los efectos hormonales; y por último el AMPc es degradado a 5'AMP por la enzima fosfodiesterasa, la cual es inhibida por metil xantinas (cafeínas, teofilina, aminofilina), por lo tanto el agregado de uno de estos compuestos potencia la acción hormonal, manteniendo los niveles de AMPc artificialmente elevados.

Las hormonas han sido conocidas por mucho tiempo como sustancia de extraordinaria potencia, esto se debe a que existe una "amplificación química". Según el modelo propuesto por Sutherland, el AMPc sería el mensajero intracelular o segundo mensajero y la hormona representaría la señal externa o primer mensajero (1),(7). De la unión de la hormona a un receptor específico en la cara externa de la membrana, resultaría una interacción con la adenil ciclase ubicada en la cara interna de dicha membrana, que se traduciría en una variación de los niveles intracelulares de AMPc. Esta variación de la concentración de AMPc provocaría a su vez una respuesta específica en la célula.

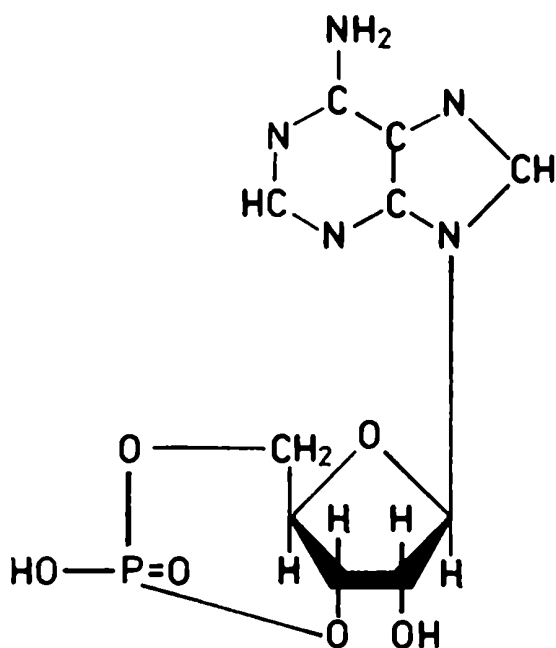


Figura 1. Estructura de la molécula de AMP cíclico.

En la figura 2 se esquematiza el modelo de los dos mensajeros.

De tal forma, cuando una hormona, por ejemplo el glucagón, aumenta su concentración de  $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  M se produce un aumento en la concentración intracelular de AMPc de  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M y provoca una variación de los niveles de glucosa-6-fosfato en hígado de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M, que implica una amplificación de la señal del orden de un millón de veces.

Siendo la fosfodiesterasa, junto con la adenil ciclasa, una de las dos enzimas responsables del balance intra-



celular de AMPc, es muy posible que esté sometida a un estricto control regulatorio. Gradualmente, pudo entreeverse que esta actividad enzimática está sometida a controles muy sutiles por parte de ciertos factores, siendo uno de ellos los iones  $Ca^{2+}$ .

Los estudios realizados han abierto un nuevo panorama en el control del metabolismo celular, control en el que estaría involucrado el  $Ca^{2+}$  como segundo mensajero con funciones de amplificación de señales extracelulares.

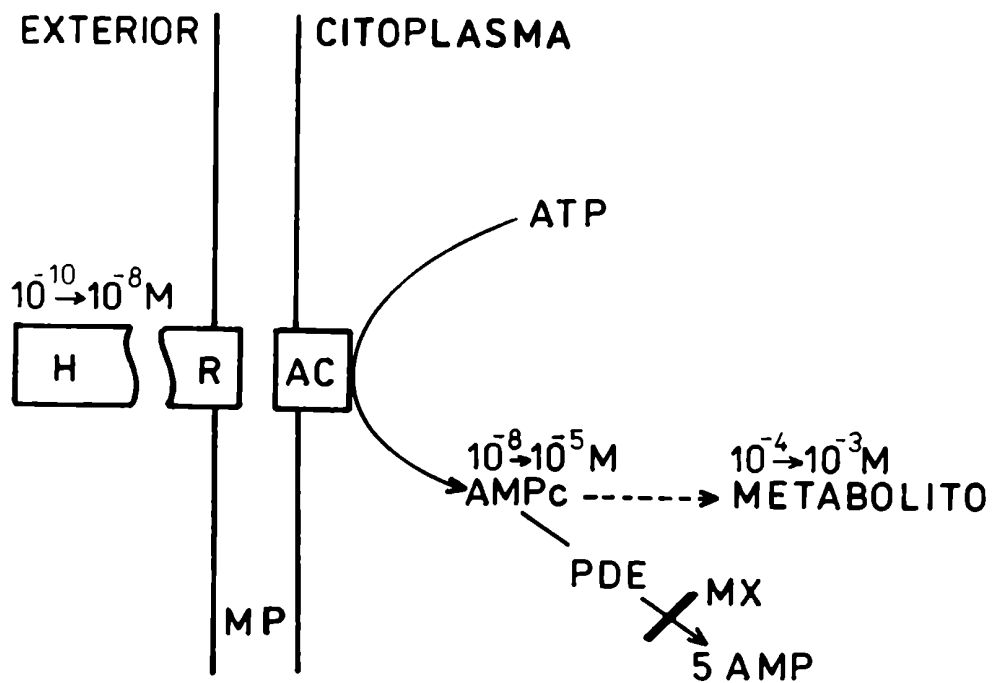
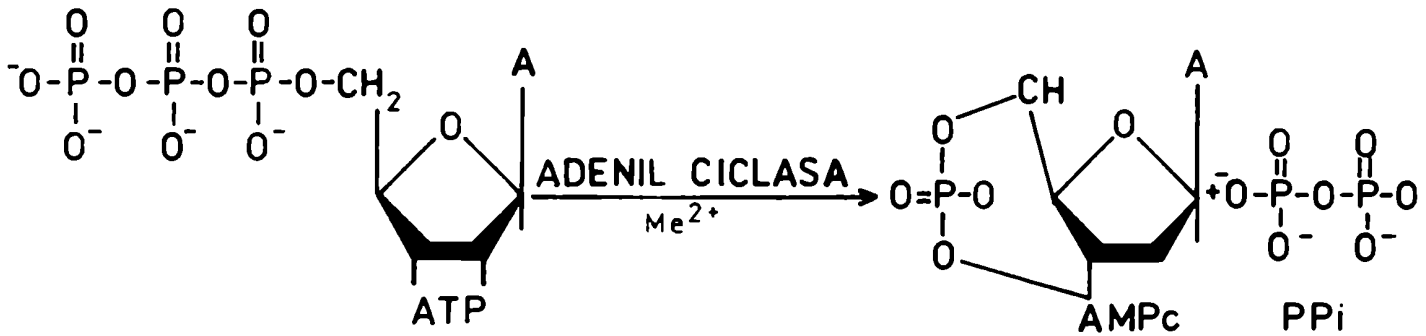


Figura 2. Modelo de los dos mensajeros.  
H: hormona; R: receptor; MP: membrana plasmática;  
AC: adenil ciclasa; PDE: fosfodiesterasa de AMPc;  
MX: metilxantina.

## II. ADENIL CICLASA

La adenil ciclasa (ATP pirofosfato liasa ciclante E.C.4.6.1 1) es la enzima responsable de la síntesis del AMPc según la reacción:



Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos  $MgATP^{2-}$  o  $MnATP^{2-}$ , actuando los cationes divalentes  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como activadores de la misma. En el caso de algunas ciclasas como la de Neurospora crassa (8), testículo (9) y Trypanosoma cruzi (ver resultados) la dependencia de  $Mn^{2+}$  es casi absoluta. Si bien la concentración intracelular de  $Mg^{2+}$  es hasta cien veces mayor que la de  $Mn^{2+}$ , la mayor esta-

bilidad que posee el complejo del último catión con el ATP, podría explicar que la enzima funcione "in vivo" con ambos cationes (10).

La reacción catalizada por la adenil ciclasa se considera termodinámicamente reversible, y bajo ciertas condiciones puede ocurrir (11).

#### II-1. Distribución y localización.

La actividad de adenil ciclasa se ha detectado en todas las células animales estudiadas (12), [excepto en eritrocitos caninos (6)], en sistemas eucariotes inferiores tales como protozoarios (13), hongos (8), levaduras (14) y también en bacterias (15), (16).

En las plantas superiores no existen evidencias concluyentes sobre la existencia de AMPc ni de las enzimas implicadas en su síntesis (17).

En todas las células eucariotes estudiadas, la adenil ciclasa se encuentra asociada a membrana plasmática, siendo excepción a esta regla la enzima de los túbulos seminíferos cuya localización es citoplasmática (18) (9). Davoren y Sutherland (19) demostraron que la adenil ciclasa de eritrocitos de paloma sedimentaba con una fracción particulada, que no está localizada predominantemente en la fracción mitocondrial y que podía ser separada de contaminante nucleares por centrifugación en soluciones de glicerol al 20%. Una demostración definitiva de la localización de esta enzima la realizaron Rodbell y colaboradores (20) al establecer la existencia de actividad de adenil ciclasa en membranas plasmáticas de hepatocitos, purificadas por el método de Neville (21).

Existen trabajos que describen la existencia de actividad de adenil ciclasa asociadas a organelas subcelulares tales como microsomas (22), núcleos (23) y retículo endoplásmico (24); sin embargo, en ninguno de estos casos las bajas

actividades encontradas demuestran fehacientemente que no existan contaminaciones de membranas plasmáticas (25).

En organismos eucariotes inferiores y bacterias, como se verá más adelante, la asociación de la enzima a la membrana en muchos casos es bastante débil.

## II-2. Componentes proteicos del sistema adenil ciclasa hormono-sensible.

Si bien en un principio se supuso que el sitio de unión de la hormona y el sitio catalítico de la enzima estaban localizados en la misma cadena polipeptídica (26), posteriormente, Robinson, Bütcher y Sutherland en 1967 (27) propusieron un modelo que asumía para la enzima, la existencia de dos subunidades con una orientación direccional específica (figura 3). El receptor, interaccionaría por el lado externo de la membrana con la hormona correspondiente lo cual llevaría a una alteración de la subunidad catalítica de la enzima en la cara interna de la membrana, provocando una activación de la misma.

En este momento, está claro que los receptores hormonales son proteínas diferentes de la adenil ciclasa. Esta idea surgió primeramente de estudios cinéticos de activación de la adenil ciclasa, particularmente en membranas de adipocitos en donde una diversidad de hormonas parecen competir por un número fijo de moléculas de enzima (24) (28). Otros argumentos respecto a la no identidad del receptor hormonal y la enzima surgieron de la observación de su independiente regulación ontogénica (29) (30). Schramm (31) observó que la N-etil maleimida inactivaba la adenil ciclasa pero no destruía la capacidad de unión de ligandos a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de eritrocitos de ave y que la N,N-diciclohexilcarbodi-

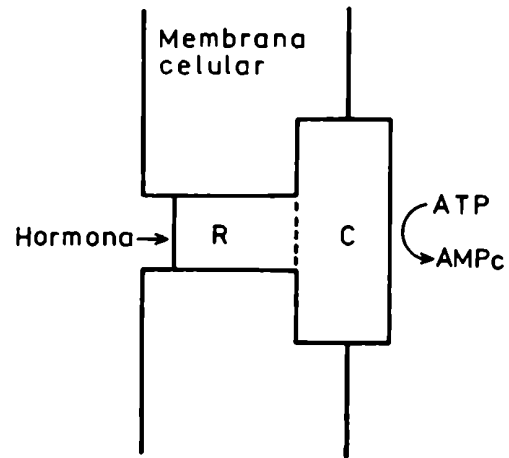


Figura 3. Modelo de Robinson y colaboradores de los componentes proteicos del sistema adenil ciclasa asociada a membranas.

mida inhibía la unión del ligando iodohidroxibencilpindolol a sitios  $\beta$ -adrenérgicos, a concentraciones que no afectaban la actividad enzimática (32).

Por otro lado, Insel y colaboradores (33) demostraron que dos clones de células provenientes de hepatoma de rata y de una variante de linfoma de ratón S49, que eran deficientes fenotípicamente en adenil ciclasa, poseían receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Esto es indicativo de la existencia de dos proteínas diferentes. Finalmente ambas estructuras, receptor y enzima, pudieron ser separadas físicamente y caracterizadas molecularmente (34) (35).

Rodbell propuso un modelo alternativo al de Sutherland en el cual introducía una entidad con función de intermediario entre el receptor y la unidad catalítica (36). Cuando se observó el requerimiento de nucleótidos de guanina para la activación hormonal se le atribuyó al intermediario o proteína regulatoria poseer el sitio de unión para dicho nucleótido.

La existencia de proteínas regulatorias fue demostrada por Pfeuffer, que mediante el uso de una columna de afinidad GTP-agarosa logra separarla de la actividad adenilato ciclasa (37) (38), mientras que Ross y Gilman lo confirmaron por medio de estudios genéticos.

Así pues, actualmente se supone que la adenil ciclasa sensible a hormonas consta al menos de tres tipos de proteínas: receptor (R), proteína regulatoria (N) y componente catalítico (C) (39).

#### II-2.1. Componente catalítico (C).

Poco es lo que se conoce acerca de las propiedades del componente catalítico (C) de la adenil ciclasa. Esto se debe a su labilidad y dificultad en obtener preparaciones purifi-

cadras de la protefna.

La mejor preparaci3n del componente catalftico para su caracterizaci3n se obtuvo de un extracto de membranas plasmáticas de una variante de linfoma S49 que es carente en componente regulatorio (40) (41). De esta manera se pudo determinar para esta protefna que:

- la actividad de la adenil ciclasa con Mg-ATP<sup>2-</sup> es menor del 10% de la actividad con Mn-ATP<sup>2-</sup>.
- esta actividad no es estimulada por hormonas, i3n fluoruro o nucle3tidos de guanina.
- es sensible al calentamiento suave y a agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilos.
- Ross y colaboradores determinaron para el componente catalftico de dicha variante un peso molecular de 190.000 D (41).

En 1981 Ross obtuvo la separaci3n de C y N mediante la solubilizaci3n de la adenil ciclasa de hepatocitos con colato de sodio y alta fuerza i3nica (42). La caracterizaci3n de C en esta preparaci3n arroj3 resultados similares a los alcanzados en la variante de linfoma S49.

Una adenil ciclasa soluble, insensible a hormonas y dependiente de Mn<sup>2+</sup> se encontr3 en testfculo (43) (18). Esta enzima sin embargo no interactúa con el componente N en sistemas reconstituídos (40).

## II-2,2. Componente regulatorio (N).

Ultimamente los estudios del sistema adenil ciclasa se han focalizado en el componente regulatorio. Como se describi3 anteriormente, la existencia de esta protefna se demostr3 por cromatografía de afinidad GTP-agarosa (38). El componente N interacciona con guanil nucle3tidos y sus análogos no hidro-

zables. Tal propiedad ha sido confirmada con la proteína purificada (45).

La existencia de un sitio de unión para guanil nucleótidos en N fue inicialmente sugerida por la capacidad de retener la proteína por columnas de afinidad conteniendo GTP y por los resultados obtenidos al "marcar" las membranas de eritrocito con [<sup>32</sup>P]GTP- $\gamma$ -azidoanilida. Esta última evidencia reveló la presencia de una proteína de peso molecular 42.000D que podría ser parte integrante de N (38). El componente N es además portador de una actividad GTPásica (46).

El componente N también contiene un sitio para la interacción con la toxina del cólera. Esta toxina estimula la adenil ciclasa como resultado a la ADP-ribosilación del componente N en presencia de NAD (46). Dicha ADP-ribosilación causa la inhibición de la referida actividad GTPásica que es fundamental para la desactivación de la enzima (47). Cuando se incubaron membranas plasmáticas de eritrocito con [<sup>32</sup>P]NAD y tóxina del cólera, se evidenció que el componente ribosilable es una proteína de 42.000D.

La magnitud de la modificación de la proteína se correlacionaba con la activación de la enzima. Posteriormente se demostró que dos proteínas en membranas de células del linfoma S49 se marcaban específicamente con tóxina del cólera y ellas poseían un peso molecular de 45.000 y 52.000 D, mientras que no había marcación de la proteína en la variante carente del componente N.

Northurp y colaboradores (49), trabajando con membranas de hígado de conejo, llevaron a cabo la purificación del componente regulatorio; el análisis de la preparación indicó que estaba compuesta por tres polipéptidos con pesos moleculares aproximados a 52.000, 45.000 y 35.000 D.

Funcionalmente se han distinguido dos tipos de unidades N, una llamada Ns que media los procesos de estimulación



y otra Ni que está involucrada en la inhibición de la adenil ciclasa (50). Ns está formada por dos subunidades, una de 35.000 D ( $\beta$ ) y otra de 42-45.000 D ( $\alpha$ ) (51). La activación de Ns es el paso limitante de la velocidad de activación de la enzima y es probablemente el resultado de la disociación de las dos subunidades, dependiente de  $Mg-GTP^{2-}$ . El sitio para GTP está localizado en la proteína de mayor peso molecular al igual que el de ADP-ribosilación. Recientes estudios sugieren que Ni también está compuesta por dos subunidades, una de 35.000 D ( $\beta$ ) probablemente idéntica a la de Ns, y una de 39.000-41.000 D ( $\alpha$ ) la cual puede ser ADP-ribosilada específicamente por la toxina de Bordetella pertussis (52) (53).

### II-2,3. Receptor hormonal (R).

Muchas hormonas ejercen su acción por alteración de la actividad de la adenil ciclasa. Estas actúan uniéndose específicamente a una proteína receptora (R) que está expuesta en la superficie externa de la membrana plasmática; el receptor ocupado interactúa indirectamente con la enzima.

De acuerdo a las evidencias obtenidas por Cassel y Selinger (47) el complejo receptor-hormona determina a nivel de componente N, el intercambio de GDP por GTP (ver más adelante).

### II-3. Regulación por GTP.

Kipnis y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el GTP y derivados ejercen diversos efectos (estimuladores e inhibidores) sobre la actividad de adenil ciclasa (58). La intensidad y naturaleza del efecto sobre la enzima es dependiente del tipo de nucleótido, la hormona, el tipo

de célula, fuerza iónica, concentración de cationes, etc (59).

La observación clave sobre la posible función del GTP, fué que este nucleótido es un requerimiento absoluto para la estimulación hormonal de la adenil ciclasa (60). Esto fue corroborado posteriormente en diferentes tipos de células (61).

En los últimos años se ha demostrado además la inhibición de la actividad de la adenil ciclasa por neurotransmisores (62) que requiere de la presencia de GTP.

Una característica que tienen los nucleótidos de guanosina es la de modificar la cinética de interacción entre el receptor y la hormona. Rodbell y colaboradores (63), estudiando la adenil ciclasa de membranas de hígado de rata, fueron los primeros en observar que los nucleótidos de guanosina disminuyen la afinidad del receptor por la hormona, dando como resultado un aumento de la velocidad de disociación del complejo hormona-receptor. Este efecto, que ha sido descrito con posterioridad para receptores de glucagón (64), prostaglandina  $E_1$  (65) y agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (66), es específico para los ligandos agonistas y no modifica la interacción receptor-antagonista (67) (68).

Estudios realizados empleando análogos del GTP no hidrolizables, tales como: Gpp(NH)p, Gpp(CH<sub>2</sub>)p, GTP- $\gamma$ -S, demostraron que la activación de la adenil ciclasa, en estos casos, se produce en ausencia de hormona, llegando a valores superiores que los que se obtiene con fluoruro o GTP más hormona. Este proceso es muy poco reversible (69). Posteriormente, se demostró que la hormona producía un incremento en la velocidad de activación de la enzima por el Gpp(NH)p, sin modificar la actividad final alcanzada (70).

Cassel y Selinger reconocieron la existencia en membranas de eritrocito de pavo de una actividad hidrolítica del GTP (GTPasa) estimulable por catecolaminas e inhibible por

enterotoxina del cólera (47).

En base a sus hallazgos, los autores propusieron un modelo (figura 4) según el cual el estado activo de la enzima es el complejo C-N-GTP, la hidrólisis del nucleótido por la GTPasa disocia dicho complejo. Según este modelo, la inhibición de la hidrólisis del GTP por la enterotoxina del cólera o el reemplazo del GTP por un análogo no hidrolizable, originarían una sustancial activación de la adenil ciclasa por estabilización del complejo antedicho.

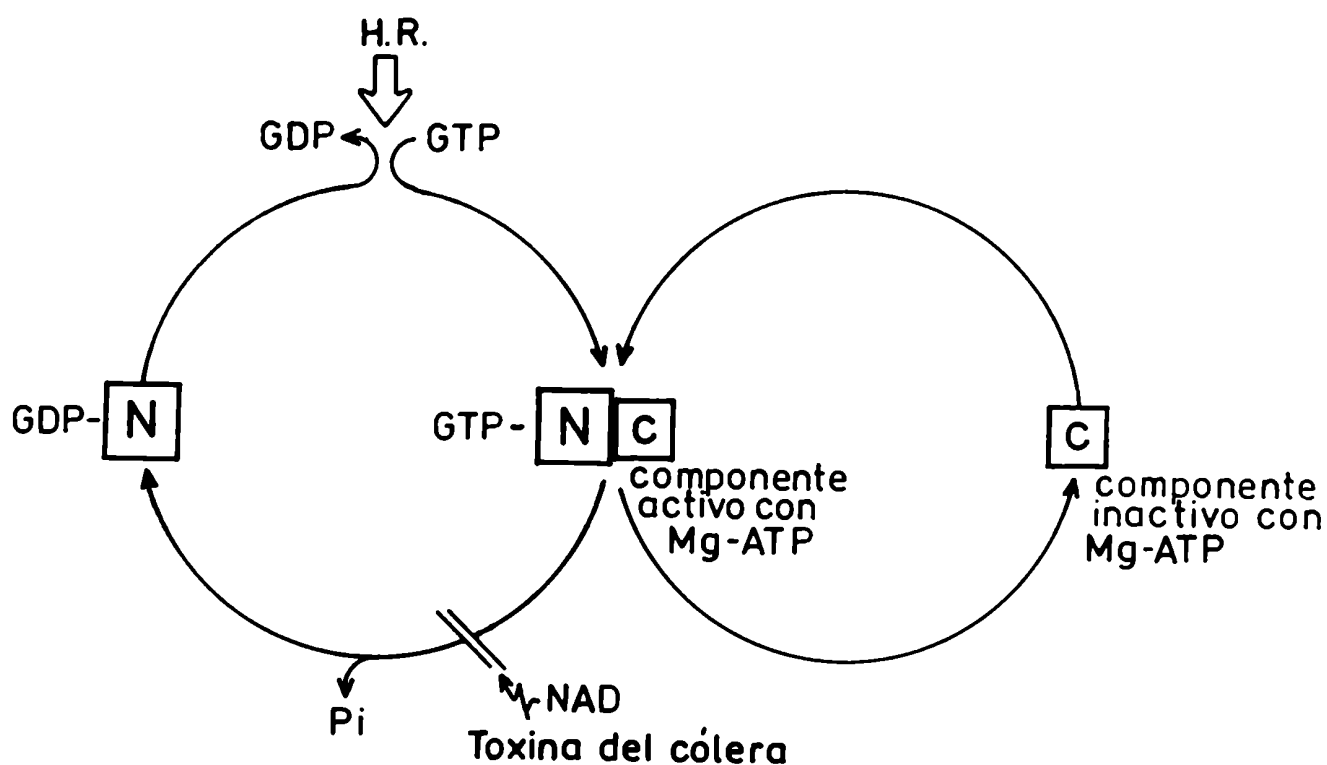


Figura 4. Modelo propuesto por Cassel y Selinger para explicar la activación de la adenil ciclasa por GTP y toxina del cólera.

El complejo receptor-hormona (H.R) determinaría a su vez el intercambio de GDP por GTP a nivel de N. Una cuestión importante de este modelo, es que explica cómo la adenil ciclasa puede ser regulada de ambos lados de la membrana celular: por el lado externo mediante la activación hormonal del receptor, y por el lado interno a través de agentes capaces de bloquear o modificar la actividad GTP-ásica (72), como por ejemplo la enterotoxina del cólera.

#### II-4. Activación por toxina del cólera.

El cólera es una enfermedad producida por una enterotoxina secretada por el Vibrio cholerae. Esta toxina causa un aumento del flujo salino desde la serosa al lumen del intestino delgado y como consecuencia de ello los enfermos experimentan una grave deshidratación (73) (74).

El flujo salino y los cambios asociados son acompañados por un incremento de los niveles intracelulares de AMP cíclico. Esta proteína activa la adenil ciclasa sensible a hormonas de prácticamente todas las células animales estudiadas (75).

La molécula de la enterotoxina está formada por dos subunidades de 29.000D (proteína A) y 54.000D (proteína B), respectivamente. A su vez, la proteína A está constituida por 2 fragmentos. A<sub>1</sub> (25.000D) y A<sub>2</sub> (7.000D), cuya asociación está dada por puentes disulfuro (76).

La secuencia de eventos involucrados en la acción de esta toxina, se inicia con la interacción de la misma con su receptor en la membrana plasmática. Este receptor, el monosialo-gangliósido GM<sub>1</sub>, está presente en la membrana plasmática de casi todas las células de mamíferos (77) y su interacción con la enterotoxina se produce a nivel de la proteína B (73) (78). Luego de ello, la proteína A se separa del com-

plejo gangliósido-proteína B y ocurre la reducción de los puentes disulfuro que conectan las subunidades A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. La subunidad A<sub>1</sub> es la que finalmente activa la adenil ciclasa (79) (80).

Según el modelo propuesto por Cassel y Selinger (figura 4), la activación de la adenil ciclasa se debe a una inhibición de la GTP-asa.

En 1975 (80), Gill demostró que se requería NAD como cofactor para la acción de la toxina.

Posteriormente, se descubrió que la subunidad activa de la toxina tiene actividad de adenosina ribosil transferasa (E.C.3.2.2.5), es decir es capaz de catalizar la siguiente reacción, llamada comunmente ADP-ribosilación (81):



En el caso de la toxina del cólera, el receptor es el componente Ns, cuya actividad GTP-asa es inhibida por el proceso de ADP-ribosilación (47).

La enterotoxina utiliza como sustrato a la subunidad  $\alpha$  de la proteína Ns que constituye el componente regulador.

#### II-5. Efecto de la toxina de la Bordetella pertussis.

La Bordetella pertussis es el agente productor de la tos ferina. Este bacilo secreta una toxina, comunmente llamada toxina pertussis (82) (83).

Esta toxina, se ha demostrado (84) (85) que ADP-ribosila un péptido de peso molecular aproximadamente igual a 40.000D, que difiere del polipéptido que modifica la enterotoxina del cólera.

El sustrato de la toxina pertussis representa la subunidad  $\alpha$  de la proteína Ni, que forma parte del componen-

te regulatorio de la adenil ciclasa. Como consecuencia de esta modificación se produce una atenuación en la inhibición, mediada por hormonas, de la adenil ciclasa (86) (87) (88).

#### II-6. Efecto del ión fluoruro.

Sutherland y colaboradores en 1958 (4) (6), encontraron que el ión fluoruro estimulaba la adenil ciclasa. Actualmente este efecto se puede generalizar a todas las adenil ciclasas descritas en organismos eucariotes, con excepción de aquellas que son dependientes de  $Mn^{2+}$ .

El fluoruro no causa una acumulación de AMP cíclico en preparaciones celulares "in vivo" (7), es decir que la activación en células intactas no se produce.

El mecanismo por el cual el ión  $F^-$  activa la adenil ciclasa es aún bastante poco conocido, aunque sí se sabe que no se debe al efecto inhibitorio del ión sobre una ATP-asa (ATP fosfohidrolasa, E.C.3.6.1.3.), ya que la activación se manifiesta a concentraciones altas de ATP o aun existiendo en el medio un sistema regenerador de ATP para mantener constante la concentración del mismo. Además se sabe que el  $K_m$  aparente del ATP no cambia durante la activación por el  $F^-$  (89).

La activación por ión  $F^-$  requiere la presencia de un acción divalente y es poco reversible y dependiente del tiempo y la temperatura (90).

Existen claras diferencias entre el proceso a través del cual el  $F^-$  activa la adenil ciclasa y la activación hormonal de la misma:

1. Las adenil ciclasas solubilizadas por detergentes pierden su capacidad de respuesta hormonal y sin embargo, mantienen su sensibilidad al  $F^-$  (91).
2. La concentración de  $F^-$  que da lugar a la mitad de la estimulación máxima varía con la temperatura, mientras que la

de las hormonas no (92).

3. Las curvas que representan el efecto del  $F^-$  respecto de su concentración son hiperbólicas, sin embargo, las de las hormonas no lo son (93).
4. Las membranas celulares que han sido tratadas de tal manera que alteren sus lípidos, poseen una baja respuesta hormonal, sin sufrir alteración en la que respecta a la acción del  $F^-$ .

Se ha demostrado que el  $F^-$  es capaz de inhibir la respuesta hormonal de determinadas adenil ciclasas.

Harwood y Rodbell encontraron que el ión  $F^-$ , a temperaturas inferiores a los  $30^{\circ}C$ , inhibe la acción estimuladora de hormonas tales como ACTH y adrenalina (94), indicando la independencia de acción sobre el sistema de la ciclasa del fluoruro y las hormonas. La interacción entre la estimulación hormonal y la del fluoruro fue mejor estudiada por Mangianello y Vaughan (95), quienes demostraron trabajando con adenil ciclasa de células grasas que el  $F^-$  era capaz de inhibir el efecto estimulador del isoproterenol, mientras que el pirofosfato (1,5 mM) anulaba el efecto activador del  $F^-$  y no afectaba la inhibición del efecto del isoproterenol, lo cual indica que ambos efectos del  $F^-$  son independientes.

Pfeuffer (38) demostró que la fracción proteica que se retenía en la columna de afinidad GTP-agarosa, era la que confería sensibilidad al ión fluoruro. Es decir, que el  $F^-$  actúa sobre el componente regulatorio N.

#### II- 7 . Efecto de Calmodulina.

El  $Ca^{2+}$  está implicado en la regulación de una gran variedad de sistemas enzimáticos y en la mayor parte de los mecanismos de movilidad celular (99). La posibilidad de que el  $Ca^{2+}$  no actúe como catión libre sino asociado a una proteí-

na específica, fue sugerido por Meyer (100).

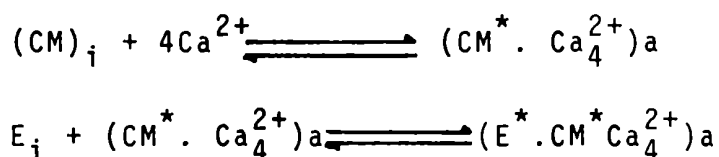
Además Cheung (101) purificando la fosfodiesterasa de cerebro bovino, encontró que un factor activador endógeno se disociaba de la enzima. Este modulador requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para su acción (102) y actúa sobre diversas enzimas, como puede observarse en la tabla I (103).

En base a su requerimiento absoluto por  $\text{Ca}^{2+}$  y por ser posiblemente el principal receptor intracelular del mismo, el factor fué llamado calmodulina.

En cuanto a su distribución, fue hallado en todos los tejidos eucariotes. Es un polipéptido de peso molecular 18.000D, de carácter ácido y estructura flexible, en la que se encuentran cuatro sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$  mediante los cuales, aunque con menor afinidad, une  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (104).

El péptido al unirse al  $\text{Ca}^{2+}$ , cambia su conformación de manera tal que aumenta la porción helicoidal de la molécula (105).

El mecanismo general de acción de la calmodulina sobre una enzima E, consta de dos etapas:



Donde CM es la calmodulina, el asterisco (\*) indica un cambio conformacional, el subíndice i indica estado inactivo y el a activo.

Tanto el EGTA que compleja el  $\text{Ca}^{2+}$ , como los agentes antipsicóticos cloropromazida y trifluoroperazina, que se unen al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina, son inhibidores de la activación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto de la calmodulina ha sido bien caracterizado en cuanto a su acción sobre la fosfodiesterasa, donde



Adenil ciclasa

Guanil ciclasa

Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos

Proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$

Quinasa de la fosforilasa

Quinasa de la cadena ligera de miosina

Quinasa de NAD

ATP trifosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$

Fosforilación de membranas

Desarmado de microtúbulos

Funciones postsinápticas

Funciones nucleares

Liberación de neurotransmisores

Tabla I. Enzimas y procesos celulares regulados por calmodulina.

se ha demostrado la formación del complejo activo (holoenzima) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (106).

En 1975, Brostrom (107) y Cheung (108) demostraron el requerimiento de calmodulina para que el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerza su efecto estimulador sobre la adenil ciclasa.

En cerebro se encontraron dos formas diferentes de adenil ciclasa, una era capaz de ser estimulada por calmodulina y la otra insensible; pero ambas inhibibles con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (109).

Tascano y colaboradores (110), trabajando con la enzima de cerebro, sugirieron que la activación de la adenil ciclasa por la calmodulina requeriría la presencia del componente regulador de la enzima. Sin embargo, recientemente Neer demostró que el componente catalítico separado del regulador es sensible a la activación por calmodulina (111).

Las implicaciones funcionales del efecto de la calmodulina sobre la adenil ciclasa y la fosfodiesterasa aún no se conocen con exactitud, El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática o la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a un estímulo, pueden activar la adenil ciclasa provocando un aumento en los niveles de AMP cíclico intracelular. El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  puede entonces activar la fosfodiesterasa para restaurar el nivel de AMP cíclico a su estado basal, Así pues, la activación secuencial de las dos enzimas podría originar un aumento transitorio y local de los niveles del nucleótido.

## II- 8. Regulación por hormonas.

Numerosas hormonas ejercen su acción celular modificando la actividad de la adenil ciclasa (7), la mayoría de ellas ejerce un efecto activador, mientras que otras como la insulina, ejercen un efecto inhibitorio de la enzima (112).

El hecho de que hormonas muy diferentes tengan como fin activar la adenil ciclasa, parecería un efecto inespecífico si no fuera por la existencia de los receptores hormonales, los cuales discriminan entre las hormonas circulante y asegura el acoplamiento con la adenil ciclasa. Esta función discriminatoria de los receptores es ejercida a nivel de la superficie externa de la membrana plasmática. Esto se evidenció por experimentos hechos por Sato (113), quien demostró que ACTH unida covalentemente a celulosa es capaz de estimular la esteroidogénesis mediada por AMP cíclico en células adrenales intactas y por experimentos del grupo de Rodbell (114), quien demostró que las células grasas al ser tratadas con tripsina, pierden la capacidad de respuesta del sistema adenil ciclasa a diferentes hormonas, sin afectar la actividad basal o la respuesta al ión  $F^-$ .

Los receptores son extremadamente específicos para las características topoquímicas de las hormonas, esto se puede evidenciar en las células grasas por la presencia de cinco tipos de receptores, cada uno de los cuales es capaz de activar la adenil ciclasa (115). Estos receptores discriminan según las características específicas locales de la molécula de hormona, como por ejemplo presentan una notable estereoespecificidad para los isómeros de catecolaminas y bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos. Reconocen diferencias sutiles en la estructura de las hormonas peptídicas, tales como eliminación o sustitución de un residuo aminoácido (116). Respecto de este último punto, se encontró que la eliminación del primer aminoácido de glucagón, la histidina, reduce la afinidad por su receptor unas 15 veces.

Los sistemas de activación de la adenil ciclasa por diferentes hormonas, poseen las siguientes características:

- 1.- Las funciones discriminatorias de los receptores acoplados a la adenil ciclasa y la consiguiente activación hormonal

de la enzima, no requieren de la integridad celular. Así pues, los estudios concernientes a las propiedades de los receptores en sistemas libres de células, proporcionan una información válida y aplicable al comportamiento del receptor "in vivo" (113) (117).

2.- La activación hormonal es un proceso rápido y reversible, es decir, desaparece al eliminar a la hormona o al añadir un antagonista (118) (119).

3.- Cada hormona estimula la adenil ciclasa en un rango que le es propio.

4.- La estimulación máxima lograda varía según la hormona de que se trate.

5.- Los antagonistas específicos bloquean solamente los efectos de los agonistas correspondientes y no los de otras hormonas.

6.- Las hormonas actúan desde el lado externo de la membrana plasmática.

En la tabla II se describen las principales hormonas que modifican la actividad de la adenil ciclasa, el tejido en el que actúan y la respuesta biológica que producen.

Existen algunas hormonas y neurotransmisores que actuando via receptores unidos a membrana, inducen rápida respuesta celulares, que son mediadas por una disminución de los niveles de AMP cíclico. Esta disminución se debe a la acción sobre la adenil ciclasa. Esto permite suponer un comportamiento dual de la actividad enzimática por hormonas, mediante receptores separados para los efectos activadores e inhibidores (27) (tabla III).

La inhibición inducible por hormonas fue inicialmente descrita en un sistema libre de células (120). Posteriormente y sobre todo en los últimos años, se han obtenido múl-

<u>HORMONA</u>	<u>TEJIDO U ORGANO</u>	<u>RESPUESTA</u>
Adrenalina	Hígado	Glucogenolisis
	Músculo esquelético	Glucogenolisis
	Miocardio	Efecto inotrópico
	Glándula salival	Secreción de amilasa
	Tejido adiposo	Lipolisis
Noradrenalina	Sistema Nervioso	Liberación de acetilcolina
	Glándula pineal	Síntesis de melatoninas
Corticotrofina (ACTH)	Adrenales	Producción de Esteroides
	Tejido adiposo	Lipolisis
Tirotrofina (TSH)	Tiroides	Hidrolisis de Tiroglobulina Iodación Oxidación de glucosa
Hormona Paratiroidea	Corteza renal	Fosfaturia
	Huesos	Reabsorción de calcio
Hormona Luteizante (LH)	Cuerpo luteo	Síntesis de Esteroides
Vasopresina	Medula renal	Reabsorción de agua
Prostaglandinas	Hipofisis	
	Tiroides	
	Bazo	
	Músculo esquelético	
Melanotrofina	Piel de anfibios	Melanización

Tabla II . Hormona, tejido u órgano y respuesta fisiológica que implican al AMPc como segundo mensajero.

tiples evidencias de este fenómeno en una gran variedad de tejidos (121).

Este efecto inhibitorio por parte de las hormonas es poco conocido, aunque está claro que son necesarias altas concentraciones de GTP para obtener una inhibición de la adenil ciclasa.

Rodbell propuso que cuando el componente Ni fuera ocupado por el GTP, era capaz de interaccionar con la subunidad catalítica y así, gatilla la inhibición (50). Hoy se sabe por estudios recientes (122) que Ni estimula a la subunidad catalítica, pero dicha estimulación es inhibida por los receptores ocupados por las hormonas inhibitorias. Bockaert y colaboradores demostraron que esta inhibición es debida a una disminución de la afinidad del  $Mg^{2+}$  en el sistema.

Es importante destacar, los efectos de la adenosina sobre la actividad de adenil ciclasa. Se ha demostrado la existencia de dos sitios de interacción de este nucleósido, física y químicamente distinguibles. Uno de ellos denominado "sitio P" (123), estaría localizado en la cara citoplasmática de la membrana, probablemente en la subunidad catalítica. A través de este sitio, la adenosina ejerce su acción inhibitoria.

El otro sitio sería el "sitio R" localizado en la cara externa de la membrana, está asociado con las respuestas de la adenil ciclasa, mediada por hormonas. Este sitio estaría subdividido en dos, uno provocaría efectos estimuladores y otro, a través del cual se producirían los efectos inhibitorios (124).

FACTOR HORMONAL

SISTEMA CELULAR

Agonistas  $\alpha$ -Adrenérgicos

Plaquetas humanas  
 Plaquetas de conejo  
 Adipocitos de Hamster  
 Adipocitos humanos  
 Hígado de rata

Agonistas Colinérgicos  
 (Muscarínicos)

Miocardio de perro  
 Miocardio de conejo  
 Parótida de rata  
 Híbridos celulares de Neuroblastoma  
 y glioma

Opiáceos

Híbridos celulares de Neuroblastoma  
 y glioma

Adenosina

Adipocitos de rata  
 Adipocitos de Hamster

ADP

Plaquetas humanas

Prostaglandinas E1, E2

Adipocitos de Hamster  
 Adipocitos de rata  
 Adipocitos humanos

Acido Nicotínico

Adipocitos de Hamster  
 Adipocitos de rata  
 Adipocitos humanos

Dopamina

Adenoma de pituitaria humana

Angiotensina II

Hígado de rata

Tabla III. Factores hormonales que producen inhibición de la Adenil  
 ciclase y Sistemas celulares donde se ha observado.

III. Modelo de interacción molecular entre los componentes proteicos del sistema de la adenil ciclasa en células superiores.

Se ha comprobado que el sistema de la adenil ciclasa sensible a hormonas es mucho más complejo en lo que respecta no solo a componentes sino también a sitios de regulación, del concepto original que se tenía (27).

En la figura 5 se muestra un esquema de los componentes del sistema y el probable sitio de acción de cada uno de los efectores.

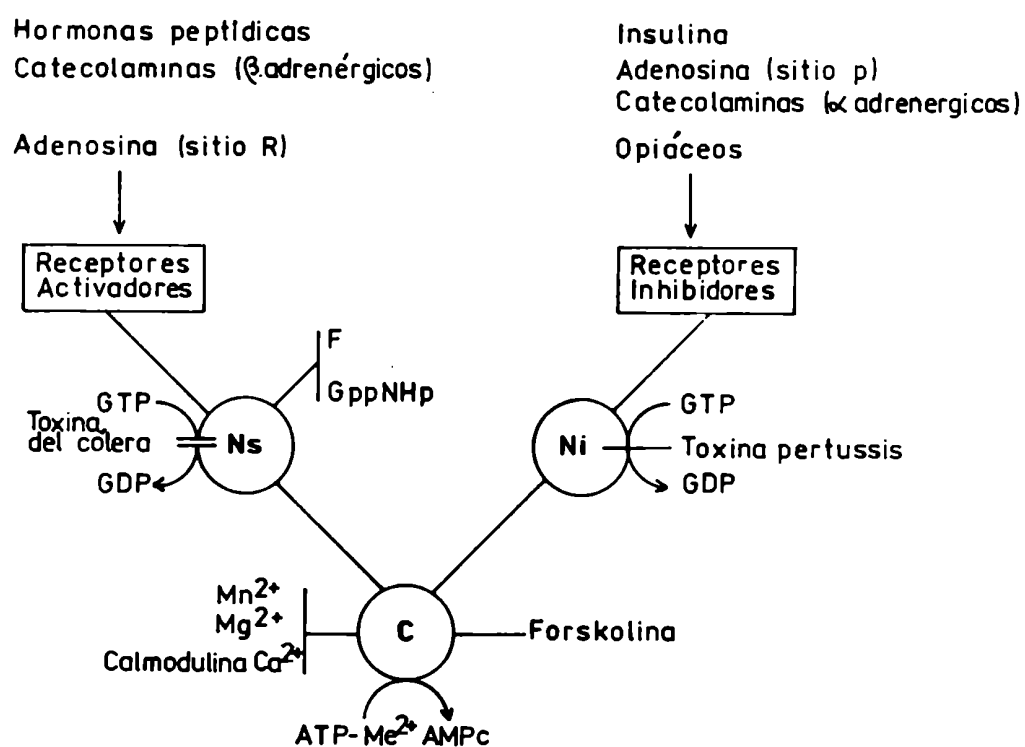


Figura 5. Representación esquemática de los componentes del sistema adenil ciclasa y el probable sitio de acción de cada ligando.



Muchas especulaciones se han hecho respecto a la unión de la hormona a un sitio específico del receptor, expuesto en el lado externo de la membrana plasmática. El receptor ocupado interacciona directa o indirectamente con la adenil ciclasa.

Surgieron diversos esquemas al respecto, como el que suponía que el receptor y la adenil ciclasa formaban parte de una misma entidad molecular que atraviesa de lado a lado la membrana. Esto fue descartado al poder separarse fácilmente, mediante detergentes, al receptor de la enzima (120). También se pensó en que los receptores podían desempeñar el papel de unidades regulatorias acopladas permanentemente a la enzima. La objeción a esta hipótesis es que, si cada receptor debe estar ligado como una unidad regulatoria a la misma enzima, resultaría difícil imaginar que tales moléculas pudieran agruparse físicamente en un único complejo en la membrana, manteniendo además la exposición hacia el exterior celular de cada componente receptor. Por otra parte, esos "complejos supra-macromoleculares" deberían ser detectados por microscopía electrónica.

En 1975, Cuatrecasas desarrolló la hipótesis del "receptor móvil" (125) basada en los conceptos de la naturaleza fluida y dinámica de las membranas celulares expuestos por Singer y Nicolson (126).

Como se ilustra en la figura 6, los receptores son entidades moleculares independientes de la adenil ciclasa capaces de migrar lateralmente en el plano de la bicapa lipídica. Cuando la hormona se une al receptor, éste incrementa su afinidad por la enzima y se produce la asociación luego de choques al azar.

Una comprobación importante que apoya la validez del modelo del "receptor móvil" se obtuvo a través de los experimentos de Schramm y colaboradores (127) (128). Estos au-

tores ensayaron la hipótesis de que el receptor ( $\beta$ -adrenérgico es una entidad independiente que puede ser transferida de un sistema de adenil ciclasa de una célula a la otra. Para ello utilizaron eritrocitos de pavo, a los cuales se les anuló la actividad ciclasa por tratamiento con N-etil maleimida o por calor, y células de la eritroleucemia de Friend (célula F), las que poseen una adenil ciclasa normal pero carece de receptores ( $\beta$ -adrenérgicos. Ambas células se fusionaron mediante virus Sendai inactivado. Las preparaciones resultantes de la fusión mostraron una actividad de adenil ciclasa estimulable por isoproterenol. Esta activación se produjo minutos después de la fusión aun en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, con lo que se demostró que el acoplamiento se hizo entre elementos preexistentes.

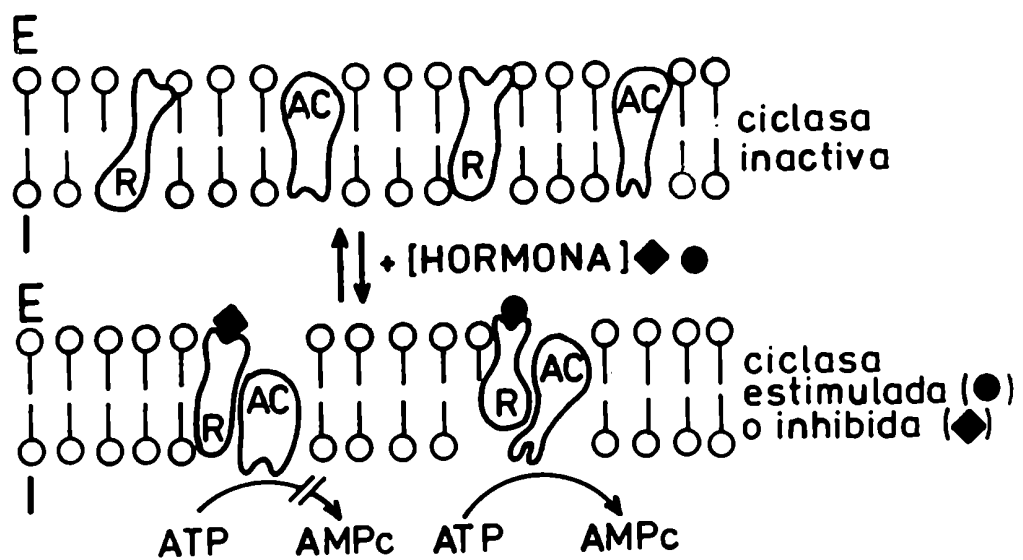


Figura 6. Modelo del receptor móvil para el mecanismo de modulación de la actividad de adenil ciclasa por hormonas.

- = hormona activante
- ◆ = hormona inhibidora
- E = exterior celular
- I = interior celular

El grupo de Schramm también logró transferir receptores de prostaglandinas  $E_1$  ( $PGE_1$ ) de células F a células adrenales de ratón.

#### IV. Rol del AMP cíclico en eucariotes superiores.

El AMP cíclico interviene en el control del metabolismo (129) en células animales, hongos, algas y bacterias.

En tejidos animales el primer efecto biológico atribuido al AMP cíclico, fue la activación en el hígado de la fosforilasa de glucógeno. Esto llevó al descubrimiento de una secuencia de eventos involucrados en el proceso, cuyo esquema se visualiza en la figura 7 y que se traducen en un incremento de la velocidad de degradación del glucógeno con formación de glucosa-1-fosfato. Esto también se vió en músculo. En ambos órganos, la fosforilasa existe en dos estados: activa (fosforilasa a) e inactiva (fosforilasa b). La condición necesaria para que la fosforilasa b se active, es su fosforilación a partir del ATP, mediante la quinasa de la fosforilasa que es dependiente de AMP cíclico. Esta última enzima, existe bajo dos formas: una activa, fosforilada y otra inactiva, desfosforilada. La conversión de la forma inactiva a la activa ocurre a través de una proteína quinasa, también dependiente de AMP cíclico (130).

Las quinasas de proteínas fueron descubiertas por Krebs y colaboradores (131); su función catalítica consiste en la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP a los residuos de serina o de treonina de las cadenas polipeptídicas en presencia de  $Mg^{2+}$ . Algunas quinasas de proteína pueden utilizar GTP en lugar de ATP (132).

En base a este criterio, se ha clasificado a las quinasas de proteínas en: dependientes de AMP cíclico (131), dependientes de GMP cíclico (133), dependientes de  $Ca^{2+}$  (134)

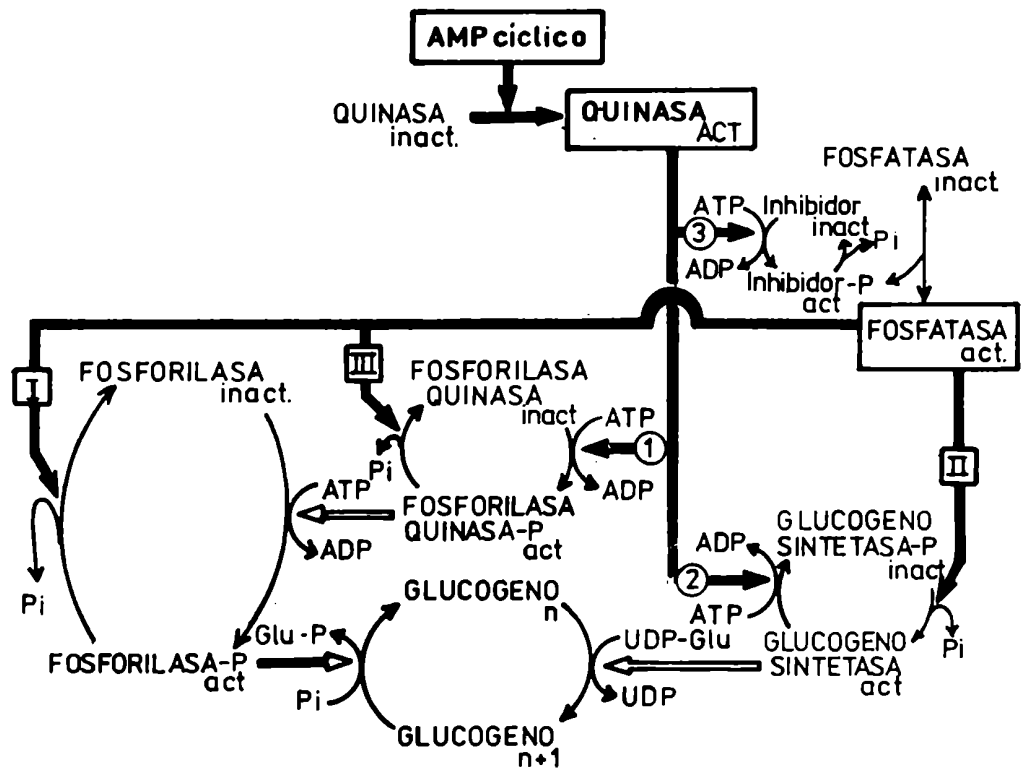


Figura 7. Control del metabolismo del glucógeno por el AMP cíclico.

y dependientes de RNA bicatenario (135).

Las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico son consideradas los verdaderos efectores intracelulares de este nucleótido y son las mediadoras de las diversas acciones del AMP cíclico en los procesos fisiológicos que ocurren en diferentes tejidos.

Se ha encontrado que también se producen fosforilaciones a nivel de las tirosinas. No se ha encontrado una correlación precisa, pero estas fosforilaciones se llevan a cabo en ciertas proteínas de células transformadas por retrovirus como también en los receptores de insulina, del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Recientemente, Goldberg (136) aisló en hígado de ratas normales una proteína fosforilada en tirosina y encontró que la actividad asociada a este evento no era estimulada por factores de crecimiento.

#### IV-1. Quinasas de proteínas.

La importancia bioquímica de las quinasas de proteínas radica en que, como se vió en el caso de la degradación del glucógeno, muchas de las proteínas que ellas fosforilan son enzimas clave de caminos metabólicos.

La fosforilación de enzimas es considerada actualmente, uno de los mecanismos más importantes de modificación covalente, reversible, post-traducciona que se refleja en cambios importantes en la actividad catalítica de la proteína modificada. La reversión de la fosforilación está catalizada por las fosfatasas de fosfoproteínas. El mecanismo general de fosforilación-desfosforilación de proteínas se esquematiza en la figura 8.

Para que las reacciones de fosforilación-desfosforilación posean una función regulatoria de la actividad enzimática, deben existir señales apropiadas que produzcan cambios en la concentración relativa de las formas fosforilada y no fosforilada del sustrato proteico. Esto puede ocurrir a través del control de la actividad de cualquiera de las enzimas involucradas en el mecanismo o de ambas simultáneamente. Las fluctuaciones en los niveles de las moléculas efectoras de dichas actividades (AMP cíclico, activadores, inhibidores) son las responsables de dicho control.

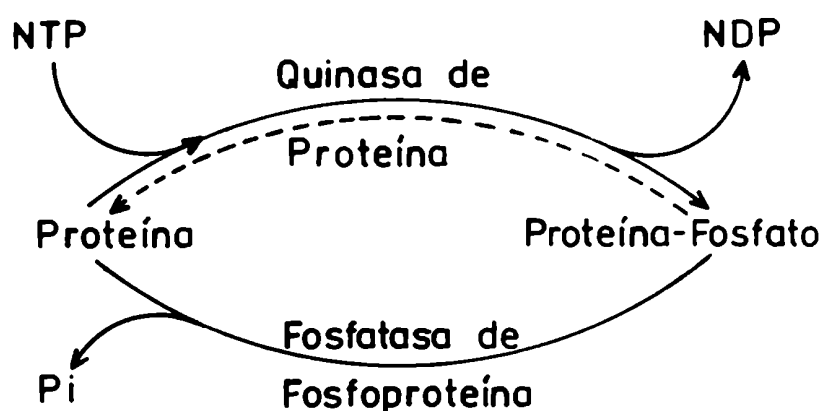
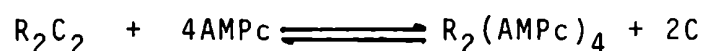


Figura 8. Mecanismo de fosforilación-desfosforilación de proteínas .  
Generalmente NTP es ATP.

Existen al menos, dos tipos diferentes de quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico, denominadas I y II. Ambas isoenzimas son proteínas tetraméricas formadas por dos tipos de subunidades: componente catalítico (C) y componente regulatorio (R). Ambas subunidades se asocian para formar una holoenzima inactiva cuya composición es  $R_2C_2$  (137). La activación por AMP cíclico logra la disociación de la enzima inactiva ( $R_2C_2$ ) en una subunidad regulatoria dimérica que une AMP cíclico ( $R_2$ ) y dos subunidades catalíticas activas (C).



Las propiedades bioquímicas de las quinasas de proteínas estudiadas en diferentes tejidos, son muy similares en lo que respecta a las subunidades catalíticas. Esto estaría indicando que se trata de una subunidad común, radicando la diferencia en la subunidad regulatoria, que origina dos categorías de quinasas: tipo I y tipo II (138).

Las principales diferencias entre ambos tipos de quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico, se refieren a su localización celular y al comportamiento de la subunidad regulatoria frente al ATP. En músculo cardíaco casi toda la enzima tipo II está unida a membrana, mientras que la quinasa tipo I se encuentra en el citosol (139) (figura 9).

Por otro lado la enzima de tipo II se autofosforila en presencia de ATP (140), incrementando la sensibilidad de la enzima al AMP cíclico (141). La subunidad catalítica transfiere un fosfato a cada polipéptido de la subunidad regulatoria ( $R_2$ ) (figura 10); esta modificación hace que la concentración de AMP cíclico necesaria para la disociación sea menor y al mismo tiempo disminuye la velocidad de reasociación en ausencia del nucleótido (142).

La quinasa tipo I no es regulada por autofosforilación sino por un mecanismo que involucra también el ATP (figura 10). La enzima no disocia una dos moléculas de ATP con alta afinidad, disminuyendo la afinidad por el AMP cíclico.

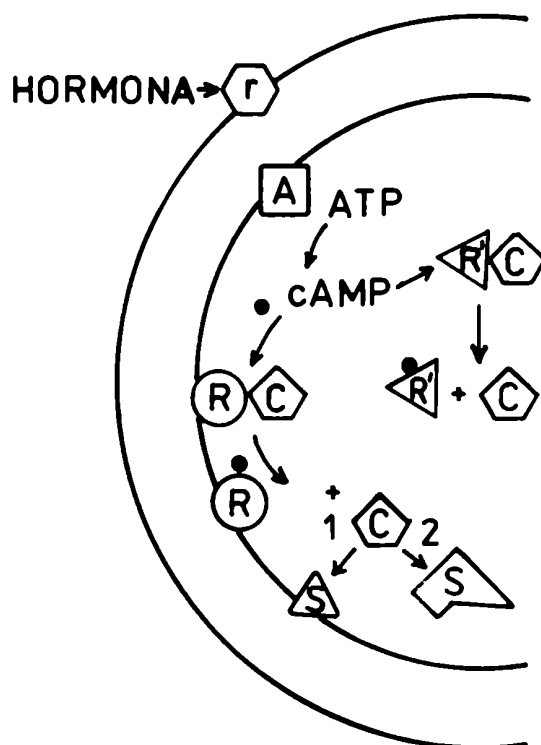
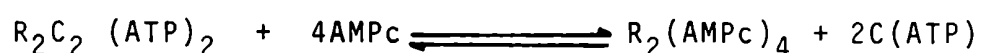


Figura 9. Modelo propuesto por Corbin (138) para el mecanismo de acción hormonal. Se propone la compartimentalización de las quinasas de proteínas. La subunidad reguladora (R) de la quinasa de tipo II estaría unida a la membrana plasmática, mientras que la de tipo I (R') estaría libre en el citoplasma. Así, la subunidad catalítica (C) (común a ambas) podría actuar más eficientemente sobre sus sustratos proteicos (S).



El ATP provoca, además, un aumento en la velocidad de reasociación en ausencia de AMP cíclico. Al encontrarse en la célula en concentraciones elevadas, este proceso requeriría mayor concentración de AMP cíclico para la activación de este tipo de quinasa (143), este requerimiento de AMP cíclico estaría dentro de los niveles intracelulares alcanzados luego de la respuesta hormonal de la adenil ciclasa.

La ecuación de activación de la quinasa de proteínas tipo I sería:



La coexistencia de estos dos tipos de quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico, implicaría que tendrían roles fisiológicos diferentes de acuerdo a sus distintas subunidades regulatorias. La quinasa tipo II sería más sensible a un aumento de AMP cíclico, que la de tipo I, éstas últimas se reasocian más rápidamente al bajar los niveles del nucleótido cíclico.

#### IV-2. Fosfatasas de fosfoproteínas.

La reversibilidad del proceso de fosforilación de proteínas se lleva a cabo por la acción de un grupo especial de fosfohidrolasas denominadas fosfatasas de fosfoproteínas.

La actividad fosfatasa que cataliza la desfosforilación de una gran variedad de sustratos proteicos en forma inespecífica, se purificó a homogeneidad, a partir de hígado y corazón (144) y se asoció con una proteína de peso molecular 35.000D, que representaría la subunidad catalítica de una

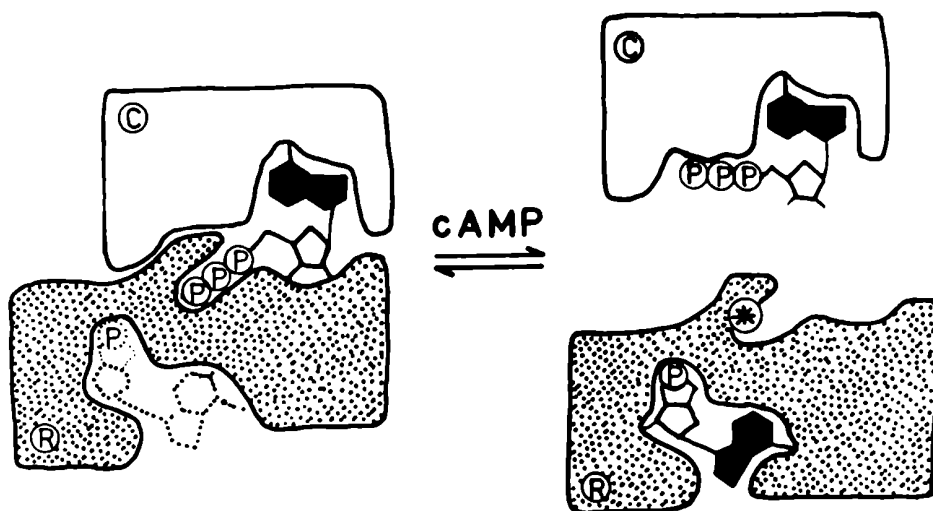


Figura 10. Mecanismo propuesto para la activación de la quinasa de proteínas de tipo I. En la célula el incremento en los niveles de AMP cíclico provoca la disociación y activación de la enzima: el nucleótido se une al sitio  $R(I)$  y la subunidad  $C$  transfiere el fosfato del ATP a sus proteínas sustratos. La disminución de los niveles de AMP cíclico origina la formación de moléculas asociadas de enzima ( $R(I)2C2$ ). A través de esta asociación el sitio para el sustrato de  $C$  (ATP) se convierte en un sitio de alta afinidad para el nucleótido trifosfato. Esta transformación del sitio del ATP origina la inhibición de la actividad fosfotransferasa. Además, el sitio de alta afinidad para el AMP cíclico en  $R(I)2$  libre, se transforma en uno de baja afinidad por la reasociación. Si la enzima es de tipo II, el asterisco marca el sitio de posible fosforilación. La incorporación de fosfato en dicho sitio de  $R(II)$  induce la disociación de la quinasa y podría inhibir la unión de alta afinidad del ATP, a la holoenzima  $R(II)2 C2$

holoenzima formada por dos subunidades catalíticas y una subunidad de peso molecular 65.000D, con posible rol inhibitorio (145).

Se demostró en diferentes tipos de tejido la existencia de dos proteínas termoestables y de bajo peso molecular, que son inhibidoras de la actividad fosfatásica denominadas inhibidores 1 y 2 (146).

El inhibidor 1 requiere su fosforilación a través de una quinasa dependiente de AMP cíclico para ser activo (147) (figura 11).

Así, el aumento en los niveles de AMP cíclico originan, por un lado la activación de las quinasas de proteínas dependientes de dicho nucleótido, y por otro la inactivación de las fosfatasas de fosfoproteínas por el inhibidor 1, lo cual supone un balance favorable en el sentido de la fosforilación proteica.

#### V-1. Adenil ciclasa en bacterias.

La existencia de la adenil ciclasa en bacterias fue puesta de manifiesto en Brevibacterium liquefaciens en 1967 (148). Posteriormente se la aisló y purificó, determinando un peso molecular para la misma de 175.000D (149). Se demostró que el piruvato era un efector alostérico positivo de la enzima y de otras pertenecientes a bacterias tales como, Micrococcus flavus, Micrococcus lysodeikticus, Arthrobacter globiformis (150). Aunque las enzimas provenientes de Escherichia coli, Bordetella pertussis, Corinebacterium equi son insensibles a piruvato. Esto ha dado lugar a que se clasifiquen las adenil ciclasas bacterianas en dependientes e independientes de piruvato (151).

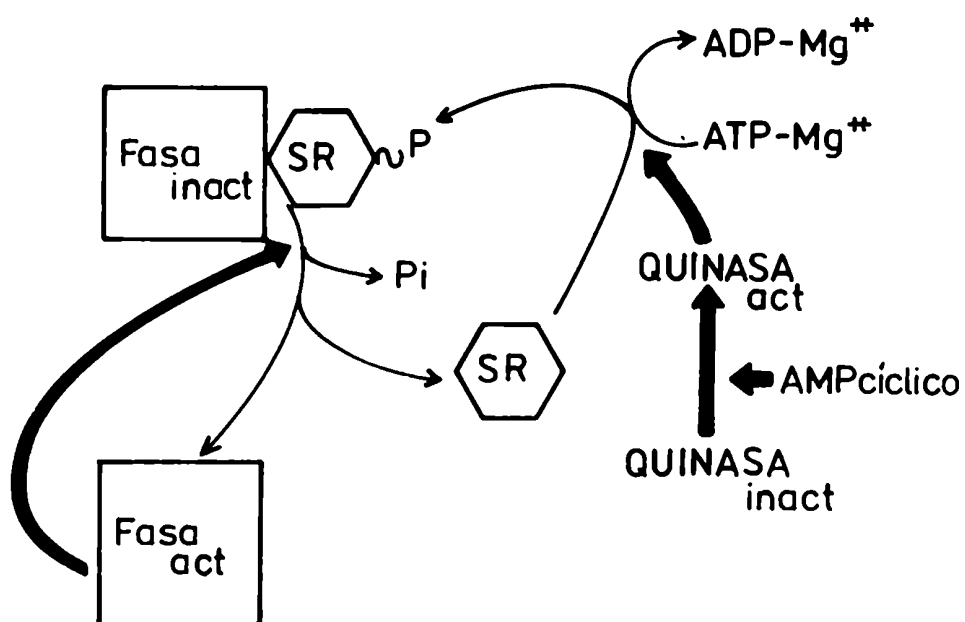


Figura 11. Regulación de las fosfatasas de fosfoproteínas. La fosfatasa activa se une al inhibidor de tipo I ( $i_1$ ) que para actuar requiere ser fosforilado por una quinasa de proteínas, dependiente de AMP cíclico.

La acción del AMP cíclico ha centrado mucha atención en bacterias tales como Escherichia coli ya que se le ha atribuido el rol de mediador en la represión catabólica por la glucosa (152) (153). Además se estudió la posibilidad de que el AMP cíclico también mediara la represión catabólica en eucariotes, para ello se usaron mutantes de hongos, Neurospora crassa y de levaduras Saccharomyces cerevisiae. En estos organismos sin embargo no pudo demostrarse que el AMP cíclico actuara en fenómenos de represión catabólica (153) (154).

#### V-2. Adenil ciclasa en protistas.

Los estudios del AMP cíclico y la adenil ciclasa en protistas han permitido dilucidar mecanismos de regulación relacionados con el mismo, además de conocer mejor las características moleculares y funcionales de la enzima responsable de su síntesis.

A continuación se detallan algunos de los estudios realizados en diferentes organismos respecto de la adenil ciclasa y su producto de reacción.

##### V-2.1. Protozoarios.

###### - Paramecium tetraurelia

Este organismo es un ciliado que representa un modelo interesante de organella excitable. Posee una membrana excitable, portadora de canales para  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a las diferencias de potencial (155). El  $\text{Ca}^{2+}$  penetra en la cilia durante el potencial de acción  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ , constituyendo la señal primaria para el movimiento ciliar (156). Se identificaron varias enzimas relacionadas con el sistema de nucleótidos cí-

clicos. La membrana ciliar contiene una guanil ciclasa (EC 4.6.1.2, GTP pirofosfato-liasa-ciclante-GC) (157), una quinasa de proteínas dependientes de AMP cíclico y otra dependiente de GMP cíclico (158) y una actividad de adenil ciclasa (159). Esta última enzima se encuentra asociada a la fracción de membranas; la actividad es 10 a 20 veces mayor en presencia de  $Mn^{2+}$  que en presencia de  $Mg^{2+}$  y no es afectada por  $F^-$ .

- Tetrahymena piriformis.

Este protozoo es un ciliado en el que los niveles de AMP cíclico varían de acuerdo al ciclo de vida. Durante la fase logarítmica de crecimiento aumenta continuamente para disminuir paulatinamente en la fase estacionaria. Esto es concordante con las variaciones en las actividades de adenil ciclasa y fosfodiesterasa. La adenil ciclasa es similar a la de eucariotes superiores, ya que es dependiente de  $Mg^{2+}$  y es afectada por fluoruro, serotonina y adrenalina (160). La diferencia es que está debilmente asociada a membrana.

En *Tetrahymena* el AMP cíclico regula como en eucariotes superiores, el metabolismo de carbohidratos a nivel de la fosforilasa del glucógeno y la glucógeno sintetasa (161).

V-2.2. Mucor.

Tanto Mucor racemosus (162) como Mucor rouxii (163) son ficomicetes dimórficos que al ser crecidos en condiciones aeróbicas, desarrollan forma micelar mientras que cuando lo hacen en anaerobiosis adquieren características levaduriformes. Se encontró además que cuando se cambia en los medios de cultivo de una atmósfera anaeróbica a una aeróbica, se produce una disminución de los niveles de AMP cíclico. Sin embar-

go, cuando se agrega dibutiril-AMP cíclico no ocurre la transición de levadura a la forma filamentosa.

Cantore y colaboradores (164) hallaron que la actividad específica de la adenil ciclasa en extractos de Mucor rouxii no variaba con la morfología del hongo. Aunque los niveles más altos de la misma aparecen en las esporangiosporas, disminuyendo inmediatamente al comenzar la germinación durante el ciclo aeróbico, para aumentar nuevamente al iniciarse la fase estacionaria de crecimiento. Esta adenil ciclasa se encuentra asociada a las fracciones particuladas, de las que se aísla por tratamiento con detergente no iónico como el Lubrol PX. Tiene dependencia estricta por  $Mn^{2+}$  y es insensible a fluoruro y guanil nucleótidos.

#### V-2.3. Saccharomyces.

Las levaduras del género Saccharomyces tales como S. cerevisiae o S. carlsbergensis, son organismos anaeróbicos facultativos cuyo crecimiento vegetativo es producido por generación. Poseen una gran capacidad de utilización de azúcares como fuente de carbono y durante su crecimiento anaeróbico están sujetos a represión catabólica.

La primera evidencia respecto del rol del AMP cíclico en el control del metabolismo en levaduras, fue obtenida por Van Wijk y Konijn (165) quienes vieron que los niveles de AMP cíclico aumentaban al cambiar la fuente de carbono. Además, Mahler y Lin (166) demostraron que el AMP cíclico agregado a S. carlsbergensis cultivadas en un medio con glucosa puede sustraerlas de la represión por catabolitos. También se vió que levaduras provenientes de cultivos con lactato o con baja concentración de glucosa aumentan los niveles de AMP cíclico en su fase estacionaria temprana (167). Sin embargo

Matsumoto (154) descartó recientemente la posibilidad de que el AMP cíclico tuviera algún rol en la represión catabólica de *S. cerevisiae*. En membranas de *S. fragilis* hallaron actividad de adenil ciclasa, la cual aumenta de tres a cuatro veces al llegar a la fase estacionaria en cultivos aeróbicos. Esta enzima en *Sacchromyces cerevisiae* se encuentra asociada a membranas y en 1983, Bourne demostró por estudios de inactivación térmica, que poseía no sólo una subunidad catalítica (C) sino también un componente N, el cual le confería la posibilidad de utilizar como sustrato  $MgATP^{2-}$  y la sensibilidad a guanil nucleótidos.

#### V-2.4. Blastocladiella.

Este ficomicete se presenta como una célula flagelada sin pared celular, que en condiciones apropiadas retrae su flagelo, sintetiza pared celular y forma un túbulo germinal (germinación) que forma un sistema rizoidal que crece rápidamente (fase vegetativa), cuando se acaban los nutrientes se inicia la esporulación (169).

En Blastocladiella emersonii la actividad de adenil ciclasa cambia durante el ciclo de vida. Durante la fase vegetativa es muy baja, aumentando considerablemente durante la esporulación; concomitantemente con ello hay un aumento de la actividad fosfodiesterásica, es decir que los niveles de AMP cíclico permanecen constantes durante la variación morfológica (170).

La adenil ciclasa de este organismo se encuentra en la membrana, tiene dependencia estricta de  $Mn^{2+}$  y no es estimulada por fluoruro ni catecolaminas



## VI. Neurospora crassa.

### VI-1. Ciclo de vida.

La *Neurospora crassa* es un hongo de la clase Ascomycetes. En la figura 12 se esquematiza el ciclo de vida de dos cepas de *Neurospora* pertenecientes a tipos de apareamiento compatibles. En el ciclo asexual crecen vegetativamente como hongos pluricelulares y filamentosos, formando esporas asexuales denominadas conidias, que pueden iniciar nuevos micelios. Cada tipo haploide de apareamiento forma durante el desarrollo vegetativo una estructura denominada protoperitecio, que es el predecesor de la estructura sexual. Al producirse la fecundación, esos protoperitecios se transforman en peritecios maduros. El apareamiento implica la transferencia de una conidia o un trozo de micelio del extremo de una hifa delgada, llamada tricógina, que sobresale del protoperitecio. La fusión se produce entre la tricógina y la célula fecundante, y los núcleos de éstas últimas se mueven hacia abajo por la tricógina hasta el interior del protoperitecio. Los núcleos de las dos estructuras de apareamiento quedan entonces asociados en parejas y se dividen sincrónicamente al mismo tiempo que comienzan a desarrollarse hifas ascógenas especiales. Las parejas de núcleos diferentes se mueven hacia las hifas ascógenas, formando cada hifa un gancho o uncínulo en su extremo. Se desarrollan entonces septos y la hifa se divide en tres células. Se produce la fusión nuclear en la célula central, en la curvatura del uncínulo, formándose un núcleo diploide (única etapa diploide del ciclo de la *Neurospora*). El núcleo diploide sufre meiosis (división de reducción) casi inmediatamente, produciendo cuatro núcleos haploides. Al mismo tiempo, la célula en que se está produciendo la meiosis se alarga rápidamente, formando una célula tubular denominada asco. Cada uno

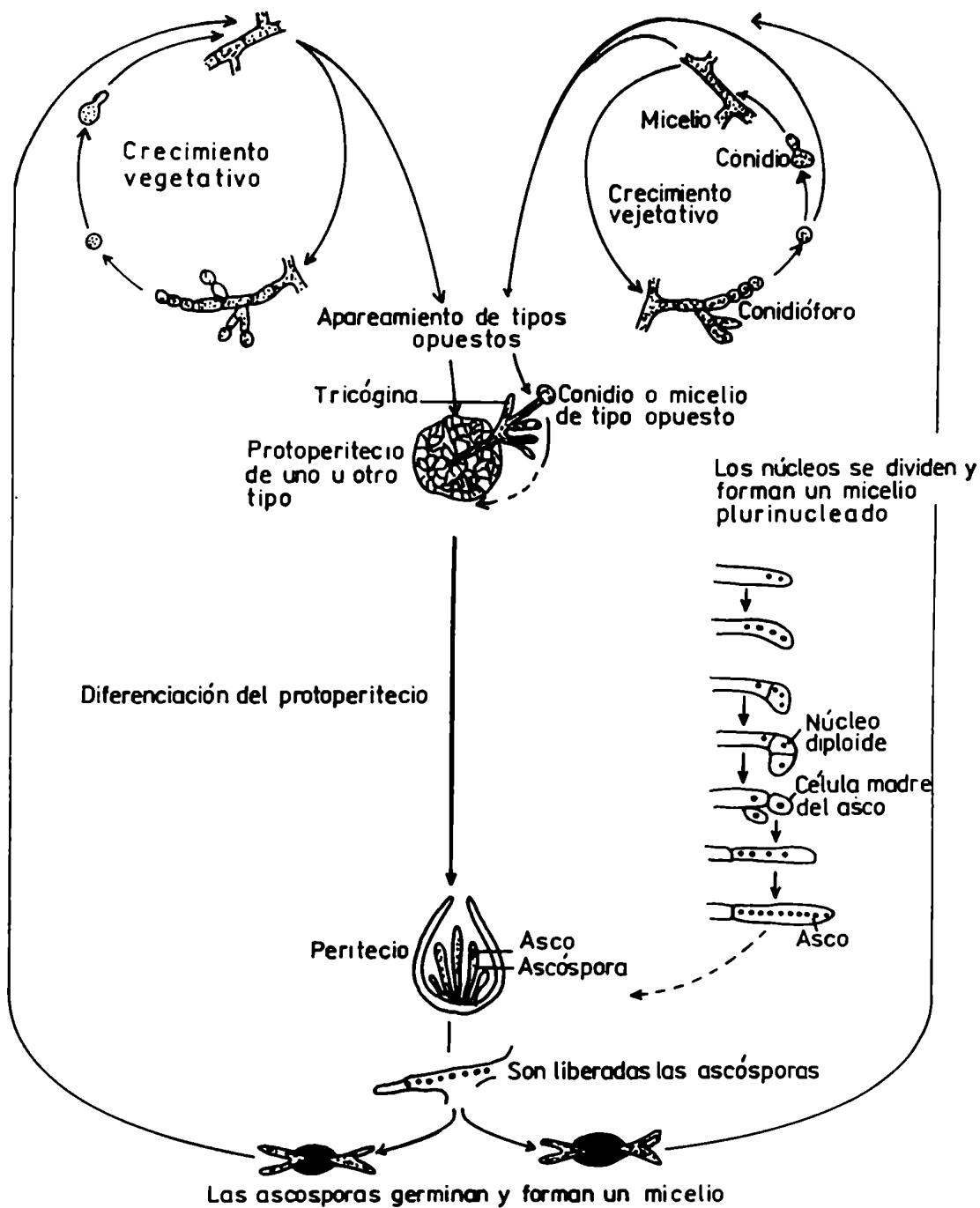


Figura 12. Ciclo biológico de *Neurospora crassa*.

de los núcleos haploides de esta célula se dividen mitóticamente, de modo que en el asco hay ocho núcleos; cada uno de ellos es el predecesor de un espora de pigmentación oscura y de paredes gruesas, el ascosporo. Durante la formación del asco y los ascoporos, el protoperitecio se alarga y madura dando lugar al peritecio también de color oscuro y paredes gruesas. Cuando este último cuerpo se rompe, son expelidos los ascos que contenfa (171) (172).

#### VI-2. Requerimientos nutricionales

La Neurospora crece en medios conteniendo carbohidratos como fuente de carbono, sales minerales y biotina como vitamina. Los hidratos de carbono utilizados generalmente son: glucosa, manosa, fructosa, xilosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, acetato y succinato. El amonio puede ser la fuente de nitrógeno, así como también nitritos, nitrato, urea, amidas, aminoácidos o purinas. Solo el fosfato inorgánico actúa como fuente de fósforo y el ión sulfato al igual que metionina y tiosulfato pueden actuar como fuentes de azufre. Son necesarios también los siguientes elementos: potasio, magnesio, hierro y oligoelementos. El pH óptimo para el crecimiento del hongo está dado entre 4,0 a 7,5 y la temperatura está entre 28 y 35°C.

Neurospora es un organismo aeróbico absoluto y no patógeno

#### VI-3. Adenil ciclasa

Flawiá y Torres (8) encontraron actividad de adenil ciclasa asociada a membranas de fracciones subcelulares de la mutante "slime" de *N. crassa* (FGSC1118). Esta mutante ca-

rece de pared celular, crece como protoplastos aislados de 15 a 30  $\mu\text{m}$  de tamaño. Esta enzima tiene dependencia estricta por  $\text{Mn}^{2+}$  y es insensible a fluoruro, catecolaminas, ACTH, guanil nucleótidos y toxina del cólera. El verdadero sustrato de la enzima es el complejo  $\text{ATPMn}^{2-}$ . El  $\text{Mn}^{2+}$  como tal es activador a bajas concentraciones del sustrato, mientras que el ATP es inhibidor porque desplaza del sitio activo al sustrato (173).

Los mismos autores la solubilizaron con el detergente no iónico Lubrol PX. De los extractos solubilizados la enzima fue parcialmente purificada y caracterizada.

Además, encontraron que incubando estas membranas con glucagón había una activación de la enzima (174) mientras que no lo había con la enzima solubilizada. Corroboraron también "in vivo" el efecto del glucagón en el control del metabolismo del glucógeno.

Por otra parte, Kornblihtt y colaboradores estudiaron una forma soluble de la enzima provenientes de cepas miceliales de *N. crassa* (175). Esta adenil ciclasa es de carácter soluble y tiene propiedades similares a la asociada a membranas respecto de  $\text{Mn}^{2+}$ , fluoruro, ATP y GTP. Los parámetros moleculares e hidrodinámicos calculados permitieron concluir que la actividad soluble es similar a la descrita para el componente catalítico (C) de los sistemas regulables por hormonas de tejidos mamíferos. Esta misma enzima posteriormente fue purificada hasta homogeneidad proteica por Reig Macía (176).

#### VI-4. Quinasas de proteínas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.

En 1974 se describió la actividad quinasa de proteínas soluble, proveniente de extractos de *Neurospora crassa*.

Esta actividad era independiente de AMP cíclico (177).

Posteriormente, Judewicz y colaboradores (178) resolvieron tres actividades de quinasa de proteínas en el eluido de columnas de DEAE-celulosa, siendo una de ellas estimulada por AMP cíclico. Esta quinasa fue caracterizada encontrándose que su peso molecular es de 118.000D y está constituida por una subunidad catalítica (55.000D) y una subunidad reguladora (57.000D) (179).

Por otro lado, Scott y Solomon (180) describieron una actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico asociada a fracciones particuladas de extractos de Neurospora crassa. Los estudios recientes de Téllez de Iñón (181) han permitido caracterizar dos actividades de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en fracciones solubles de extractos de N. crassa. Estas actividades fueron aisladas por cromatografía en DEAE-celulosa y de acuerdo a su orden de elución se las denominó fosfodiesterasa I y II. La fosfodiesterasa I utiliza como sustrato tanto AMP cíclico como GMP cíclico, mientras que la II utiliza GMP cíclico preferentemente.

#### VI-5. Diferenciación y mutantes.

En Neurospora existe una familia de mutantes denominadas "crisp", que se caracterizan por poseer un fenotipo colonial, por la carencia total de hifas aéreas y acumulación prematura de conidias. En estos mutantes está bloqueado el proceso de diferenciación que da lugar a la elongación de las hifas.

Terenzi y colaboradores (182) observaron que varias cepas con mutación en el locus cr-1 presentaban baja actividad de adenil ciclasa. La adición de AMP cíclico al medio de cultivo de estas cepas restituye en las mismas la capacidad

de elongar las hifas dando un fenotipo similar a la cepa salvaje. Esta reversión morfológica implica además una inhibición para formar conidias en la superficie del cultivo (183). Las mutantes de los loci cr-2 y cr-3 tienen el mismo fenotipo que la cr-1, pero los niveles de adenil ciclasa son normales y no revierten su morfología por el agregado de AMP cíclico (184).

En cuanto a los niveles de intracelulares de AMP cíclico, estos son muy bajos en las mutantes cr-1 y normales en las cr-2 y cr-3 (185).

Por otra parte, en cultivos en medio líquido de la cepa salvaje los niveles del nucleótido no varían, salvo el incremento durante un pequeño lapso en el comienzo de la fase estacionaria. Concomitantemente con ello hay un aumento en la actividad de la adenil ciclasa pero no en la fosfodiesterasa.

Si bien aún no se conoce con exactitud los mecanismos moleculares de la acción del AMP cíclico sobre el control de la morfología en N. crassa, se sabe de su requerimiento para la formación de hifas aéreas y para la transición del hongo al ciclo sexual de crecimiento.

#### VII. Trypanosoma cruzi.

Los parásitos de la familia Trypanosomatidae se caracterizan por tener un flagelo y un cinetoplasto únicos. El género Trypanosoma comprende parásitos digénicos que tienen por lo menos en uno de sus estadios de desarrollo la forma trypomastigote. Según Hoare (186) este género se divide en dos secciones: salivaria y estercoraria. La primera comprende un grupo de trypanosomas patógenos, que se multiplican en el mamífero en el estadio tripomastigote, completan el desa-

rollo en la estación anterior del vector y son transmitidos por inoculación; la única excepción es el T. equiperdum, que se transmite directamente de mamífero a mamífero. La segunda sección agrupa especies no patógenas, con la excepción del T. cruzi. Los parásitos agrupados en esta sección se multiplican en el mamífero como amastigotes o epimastigotes, completan su desarrollo en la estación posterior del huésped intermediario y son transmitidos por contaminación, a excepción del T. rangeli que completa su desarrollo en la estación anterior y es transmitido por inoculación.

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito cuyo ciclo de vida involucra la alternativa de dos huéspedes, un huésped mamífero y un insecto hematófago que representa al huésped intermediario o vector. Este protozoo parasita el intestino de un gran número de especies de triatominos siendo el Triatoma infestans el principal vector en nuestro medio.

Durante su ciclo evolutivo adopta aspectos morfológicos diferentes y es la existencia o ausencia de flagelo libre y su posición en relación al núcleo lo que configura su característica morfológica. El cinetoplasto, el cuerpo basal y la porción emergente del flagelo se encuentran como un conjunto estructural respecto al núcleo del parásito (figura 13).

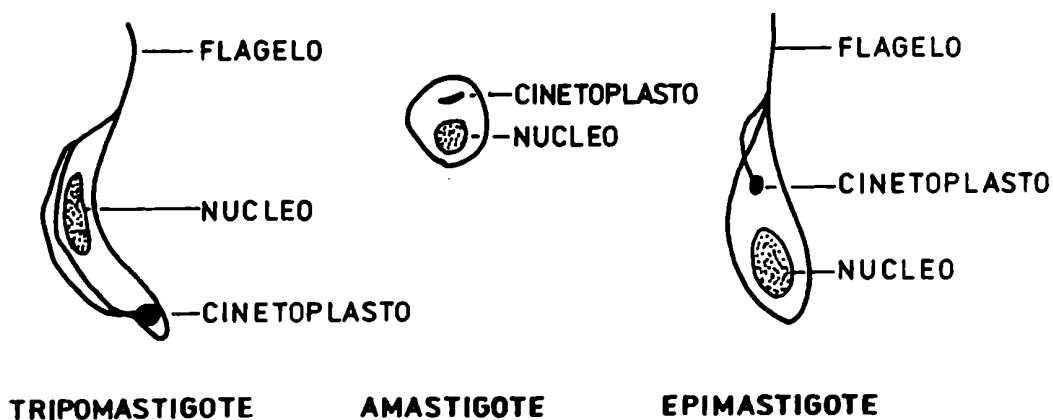


Figura 13. Diagrama que ilustra las formas morfológicas en el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

El parásito que es depositado sobre la piel o mucosas del mamífero con las deyecciones del insecto vector (tripomastigote metacíclico) puede penetrar en los tejidos del hospedador definitivo y una vez dentro de la célula del mamífero se diferencia a amastigote, forma bajo la cual se multiplica por división binaria simple, luego de varias generaciones los amastigotes se diferencian a tripomastigotes abandonando la célula huésped por ruptura de la misma, pasando a la circulación desde donde invadirán nuevas células reiniciando el ciclo. Dvorak (187) demostró "in vitro" que el número de generaciones del parásito en cada célula, a partir de un tripomastigote que penetra a la misma, es de nueve y que el tiempo de generación del parásito es de aproximadamente trece horas, variando ligeramente según el tipo de célula utilizada para el cultivo. Antes de multiplicarse el parásito presenta un período de latencia de aproximadamente 34 horas, luego de la novena generación se observa que los amastigotes se diferencian a tripomastigotes por proyección fusiforme (por lo que en algún momento se pasaría por una etapa de epimastigote) y posteriormente abandonan la célula pudiendo infectar inmediatamente una nueva célula.

El huésped intermediario que se alimenta sobre un mamífero infectado puede ingerir con la sangre al parásito circulante (tripomastigote), éste a medida que progresa en la luz del intestino se redondea y pierde la porción libre del flagelo, diferenciándose a amastigote y/o esferomastigote (en este caso conservarfa una porción libre de flagelo) (188) y luego a epimastigote, el que se multiplica activamente en la región del intestino medio, finalmente estos epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto. No se ha demostrado penetración celular en el vector pero sí una estrecha relación entre las células epiteliales del mismo y la membrana celular de *T. cruzi*. Los tripomastigotes metacíclicos son los que se clásicamente se considera que poseen



capacidad infectante. Cuando un triatomíneo infectado vuelve a alimentarse defeca mientras come y en las deyecciones habrá tripomastigotes metacíclicos que pueden penetrar en los tejidos del hospedador definitivo. En la figura 14 se esquematiza el ciclo biológico del Trypanosoma cruzi.

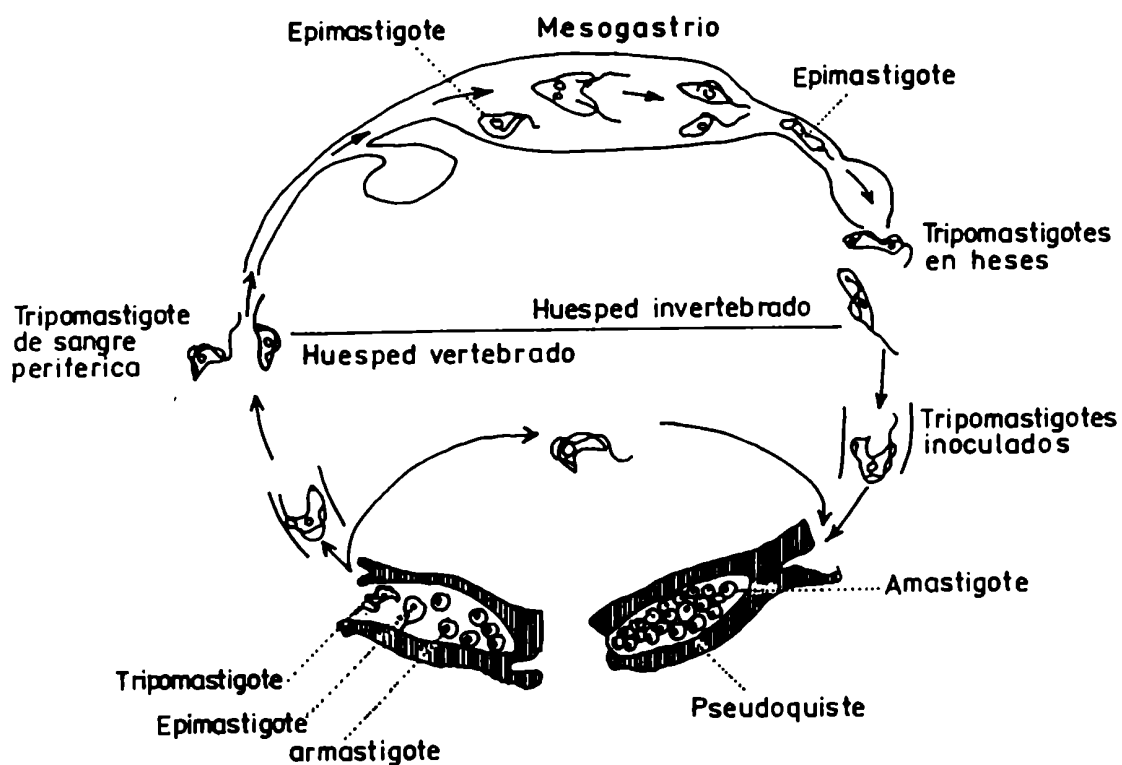


Figura 14. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*.

VII-1. Requerimientos nutricionales.

El Trypanosoma requiere para crecer de un medio muy rico y complejo. Necesita como fuente de energía glucosa o algún otro sustrato hidrocarbonado tal como citrato, acetato, succinato o glucosamina. La presencia de todos los aminoácidos es importante, al igual que la de purinas y pirimidinas. Se requieren además cantidades apreciables de cloruro de sodio y fosfato diácido de potasio. Un componente fundamental para el crecimiento es además la hemina, ya que Trypanosoma cruzi es incapaz de sintetizar el anillo de las profirinas. Según el medio de cultivo se debe adicionar suero fetal bovino o albúmina como fuente de factores de crecimiento. El pH óptimo es 7,4, dado por el tampón HEPES y  $\text{NaHCO}_3$  y la temperatura no debe superar los  $30^\circ\text{C}$ .

VII-2. Adenil ciclasa.

En 1977, Collí y colaboradores (190) describieron actividad de adenil ciclasa asociada a preparaciones particuladas de formas epimastigotes de Trypanosoma cruzi, cepa Y.

Al igual que la enzima de Neurospora, la reacción requiere, en forma estricta, como catión divalente al  $\text{Mn}^{2+}$ , constituyendo el verdadero sustrato de la misma el complejo binario  $\text{ATP-Mn}^{2+}$ , dando un valor en el coeficiente de Hill (n) con un rango entre 1.5 y 2.

VII-3. Quinasas de proteínas y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

Recientemente, Rangel-Aldao (191) ha descrito dos actividades de quinasas de proteínas provenientes de extractos de epimastigotes de T. cruzi. Ambas son independientes

de AMP cíclico, fueron aisladas por cromatografía en DEAE-sefacel y tienen similares especificidades por sustratos exógenos

En 1980, Colli y colaboradores (192) encontraron en la forma epimastigotes de *T. cruzi*, una actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico, la cual no es dependiente de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo Tellez de Iñón aisló y purificó una actividad fosfodiesterasa de AMP cíclico que al ser ensayada en presencia de  $Ca^{2+}$  es activada por calmodulina de *T. cruzi*, de cerebro bovino y de *N. crassa*. Esta activación es revertida por EGTA, clorpromazina, fenotiazina y verapamil (bloqueador del canal de  $Ca^{2+}$ ). La máxima activación la logra con calmodulina de *T. cruzi* y de *N. crassa* (comunicación personal).

#### VIII. Respuesta inmune.

La primera línea de defensa que se pone en juego ante la entrada de una sustancia extraña en un organismo, es la captación y eventual destrucción de la partícula, sea ella inerte o viva, por células especializadas denominadas macrófagos que fagocitan las partículas.

El estudio evolutivo del mecanismo conocido como fagocitosis muestra que, en los seres biológicamente menos evolucionados, comienza siendo un proceso meramente nutricional. A lo largo de la filogenia es dable observar, sin embargo, que con la aparición de células o sistemas más evolucionados y perfeccionados este proceso es reemplazado en su función primitiva y pasa convertirse en un mecanismo empleado en la resistencia del organismo a distintos agentes. Es decir, comienzan a esbozarse entonces las primeras manifestaciones de una inmunidad no específica.

La inmunidad específica, en cambio, implica no ya

la adaptación de una función, como por ejemplo la fagocitosis, a otros fines sino la creación de nuevas funciones con órganos, líneas celulares, pasos metabólicos, etc., en especial y con exclusividad dedicadas a mantener la integridad del organismo contra agresiones, sean externas o internas.

La más precoz diferenciación histológica específica ligada a la resistencia, aparece en el sistema linfoideo diseminado de los vertebrados primitivos y filogenéticamente concluye en la compleja y sutil especificidad encontrada en los vertebrados con la síntesis de una clase muy particular de proteínas, los anticuerpos, acompañada de proliferación de las células productoras de los mismos y el desarrollo de la denominada memoria inmunogénica (193).

#### VIII-1. Anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos, o más específicamente las inmunoglobulinas, son moléculas proteicas portadoras de sitios que reconocen la estructura de los determinantes o epítopes situados en la superficie de la sustancia extraña, o antígeno, y se unen a ellos.

La combinación del antígeno con el anticuerpo, desencadena ciertos procesos capaces de neutralizar y eliminar la sustancia extraña. La respuesta del anticuerpo a un antígeno típico es muy heterogénea. En el bazo de un mamífero hay hasta un millón de líneas celulares diferentes de linfocitos B, las células precursoras de las células plasmáticas que a su vez son las encargadas de sintetizar y segregar las inmunoglobulinas. Aunque todas ellas derivan de un tronco común, cada estirpe adquiere la capacidad de producir independientemente una sola especie de anticuerpo que reconoce exclusivamente a un determinante antigénico o epítope.

Cuando se inyecta un agente inmunizante en un ani-

mal, éste responde elaborando anticuerpos dirigidos contra las distintas moléculas antigénicas del material inyectado y contra los distintos determinantes de las mismas, de manera tal que se produce una gama variada de inmunoglobulinas que reconocen en grado variable a todos los sitios determinantes.

Es poco menos que imposible separar totalmente los distintos anticuerpos, por cuya razón los antisueros convencionales contienen mezclas que difieren de un animal a otro.

Cada anticuerpo se elabora en una línea distinta de linfocitos y células plasmáticas derivadas.

Si separáramos una célula tal que produzca un único anticuerpo específico para que prolifere en un cultivo, la progenie o clon de esta célula sería una fuente de grandes cantidades de un solo anticuerpo que reconoce exclusivamente a un único determinante antigénico, constituyendo así lo que se denomina "anticuerpo monoclonal". Pero lamentablemente las células secretoras de anticuerpos no pueden mantenerse en un medio de cultivo.

#### VIII-2. Anticuerpos monoclonales.

Hay ciertos tumores malignos del sistema inmune llamados mielomas, cuyas células, que poseen una gran capacidad de proliferación, producen grandes cantidades de inmunoglobulinas monoclonales anormales denominadas proteínas mielómicas. El tumor es un clon inmortal de células descendientes de una única célula progenitora; las células del mieloma pueden cultivarse indefinidamente y todas las inmunoglobulinas que segregue tendrán una estructura química idéntica. Estas inmunoglobulinas son, en efecto, anticuerpos monoclonales, pero no hay forma de saber contra qué antígeno se dirigen ni de qué modo pueden inducirse mielomas que produzcan anticuer-

pos frente a un antígeno específico.

En 1975, Milstein y colaboradores (194) pudieron fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con un determinado antígeno. Las células del mieloma híbrido resultante o "hibridoma", expresaban tanto la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos como el carácter inmortal de las células mielómicas (figura 15). Estas células híbridas o hibridomas pueden manipularse mediante las técnicas aplicables a los cultivos permanentes de células animales. Cada célula híbrida puede clonarse y cada clon produce grandes cantidades de anticuerpos monoclonales. A su vez, los clones pueden conservarse indefinidamente y en cualquier momento pueden tomarse muestras de ellos para su cultivo o inyección en animales a fin de obtener anticuerpo monoclonal en gran escala. Los anticuerpos altamente específicos producidos por este método general, han constituido una herramienta de notable versatilidad en muchas áreas de la investigación biológica y la clínica médica.

Aún cuando la fusión celular puede ocurrir espontáneamente, esto no es lo usual y por ello se requiere de diferentes agentes que incrementen notablemente el proceso y permitan un estricto control del mismo.

El agente fusogénico más comunmente utilizado es el polietilenglicol (PEG). Exactamente qué efecto ejerce el PEG es difícil de explicar, se ha medido una serie de parámetros usando diferentes concentraciones del mismo y se observó que el agua físicamente libre disminuye al aumentar el porcentaje de PEG. Se encontró que la mayor eficiencia estaba dada cuando la concentración de PEG era de 40-50% (P/V). En estas condiciones no existen moléculas de agua físicamente libre.

Recientemente se ha reemplazado, en muchos laboratorios, la fusión mediada por PEG por la electrofusión (195)

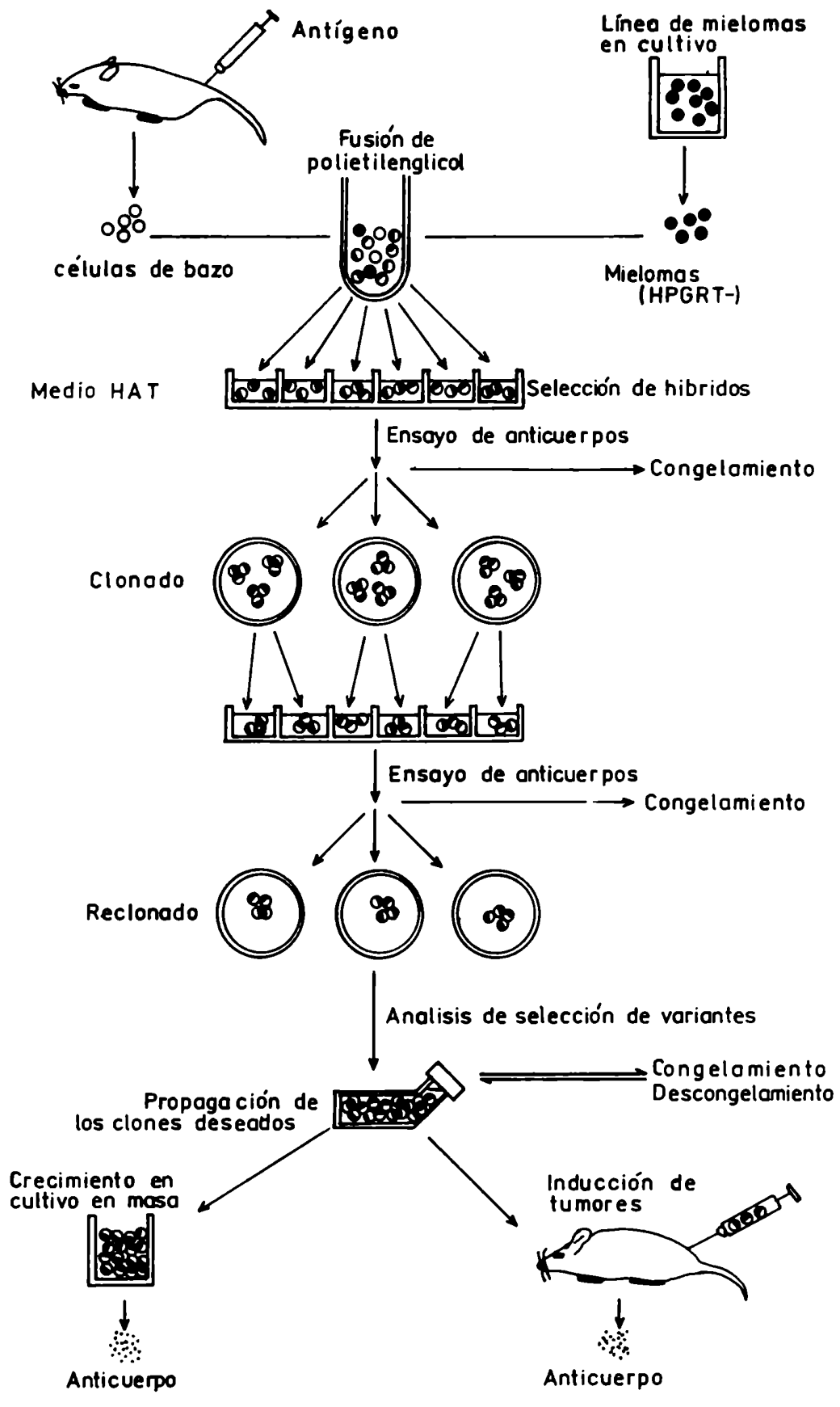


Figura 15. Método convencional de obtención de anticuerpos monoclonales.

Esta técnica se basa en dos fenómenos resultantes de la interacción de un campo eléctrico con partículas neutras en solución. El primero de ellos es conocido como dielectroforesis y produce la orientación y desplazamiento de partículas neutras en campos eléctricos no homogéneos. El segundo, está directamente relacionado con la tensión de ruptura de la membrana celular. La orientación de las células y la posterior ruptura de las membranas mediante la aplicación de un pulso de voltaje, de duración e intensidad convenientes, da como resultado la fusión celular.

Con esta nueva técnica es posible obtener un alto rendimiento en la producción de células híbridas.

Todas las células son capaces de fusionarse, pero no todas lo hacen con la misma eficiencia o poseen la misma habilidad para sobrevivir. Las células blastoides, las cuales están dividiéndose activamente, son las mejores células para fusionar con mielomas. Esto no es porque la fusión sea más eficiente sino porque es requerido que posteriormente ciertas características de ambas células parentales se expresen. Si la célula, previo a la fusión, no se encontraba en la etapa blastoide, su núcleo no entrará en división mitótica al mismo tiempo que la célula de mieloma. El resultado será una población de células mieloides donde algunas de ellas contienen un núcleo adicional que no presenta actividad genética.

Las primeras líneas de mieloma que se utilizaron para la generación de hibridomas producían inmunoglobulinas. Esto tenía el inconveniente de que los anticuerpos monoclonales producidos estaban contaminados con las inmunoglobulinas de los mielomas. Posteriormente se estableció el uso de líneas celulares que producían solo uno de los tipos de cadenas, ya sea livianas (K) o pesadas (M) y actualmente se utilizan aquellas líneas que no secretan ningún tipo de cadenas. En la figura 16 se ilustra la producción de cadenas de inmunoglobulinas que por pérdida de cromosomas da lugar a la obtención de líneas no secretantes de algún tipo de cadena de inmunoglobulina.



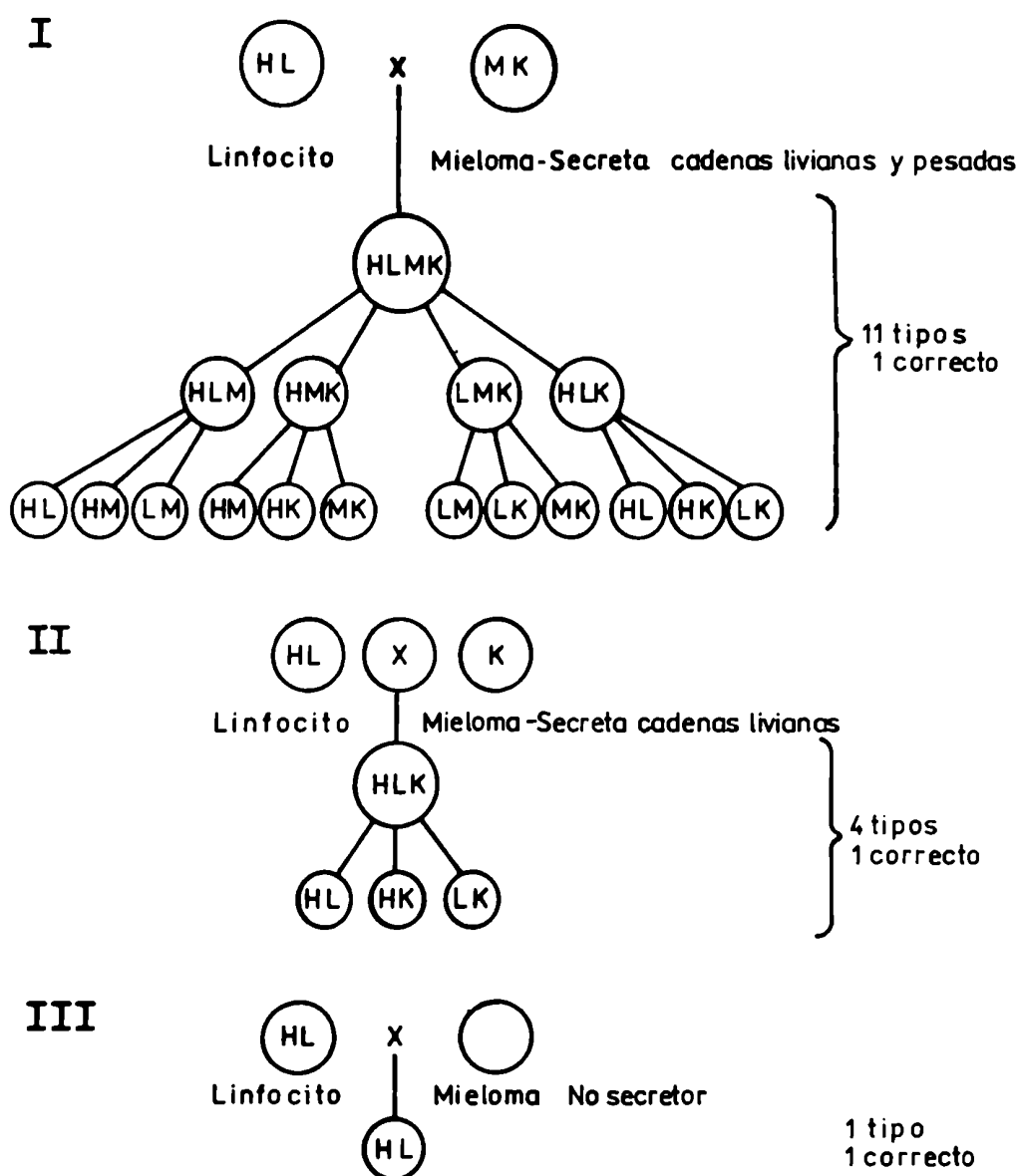


Figura 16. Producción y secreción de cadenas de inmunoglobulinas: H, L, M y K son las diferentes cadenas producidas por células inmunes o por líneas de mielomas. Las células fusionadas expresan todas las cadenas, pero por pérdida de cromosomas se expresan menos cadenas por célula.

El resultado de una fusión celular da lugar a una mezcla de células parentales, híbridos homólogos y lo más importante, híbridos heterólogos. Sin embargo, es necesario crecer estas células en condiciones tales que permitan sólo la supervivencia de los híbridos formados por linfocitos y mielomas. Usualmente se utiliza un medio selectivo conteniendo hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT) (196). Las líneas de mielomas utilizadas para este fin, son capaces de crecer y dividirse "in vitro", pero han sido seleccionadas por un defecto en la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). La selección utiliza este defecto (HGPRT<sup>-</sup>) que permite que las células sean incapaces de utilizar hipoxantina y guanina exógena y así dependen de precursores simples y de la enzima ácido fólico reductasa para sintetizar purinas.

La actividad de la ácido fólico reductasa es bloqueada por antagonistas tales como aminoptericina (ácido 4 aminofólico) y como consecuencia de ello se inhibe la síntesis de purinas y timidina. Así, la adición de aminoptericina a células HGPRT<sup>-</sup> las destruye, pues son incapaces de sintetizar purinas a pesar de existir hipoxantina exógena. La timidina agregada al medio puede ser sustrato de la timidina quinasa (TK) para formar timidina 5'-monofosfato (TMP), pero éste no tiene ningún valor si las células carecen de purinas.

De esta forma, las células resultantes de la fusión serán HGPRT<sup>+</sup> y serán capaces de utilizar la hipoxantina exógena (y también timidina, si tienen TK). A pesar de poseer un bloqueo en la síntesis de purinas, por la presencia de aminoptericina, estos híbridos pueden sintetizarlas y también TMP por la vía de rescate.

En las figuras 17.1, 17.2 y 17.3 se muestran los aspectos bioquímicos del proceso.

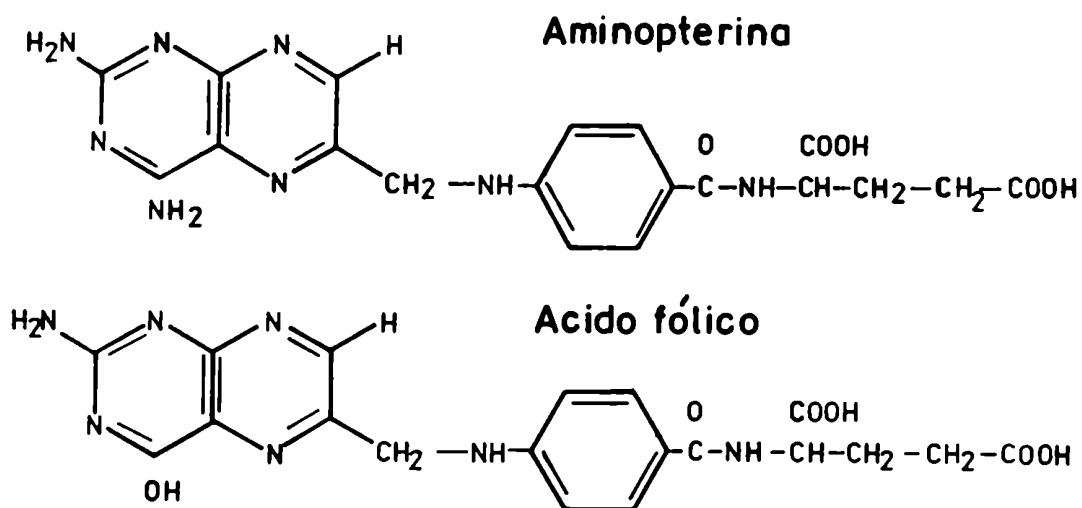


Figura 17.1. Estructura de aminopterin (ácido 4-aminofólico) y del ácido fólico.

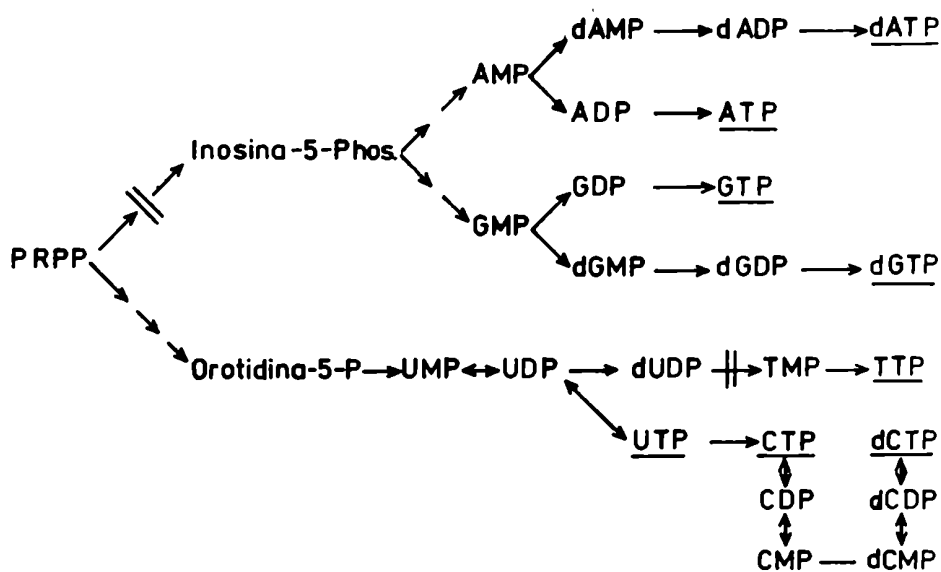


Figura 17.2. Síntesis de purinas y pirimidinas.

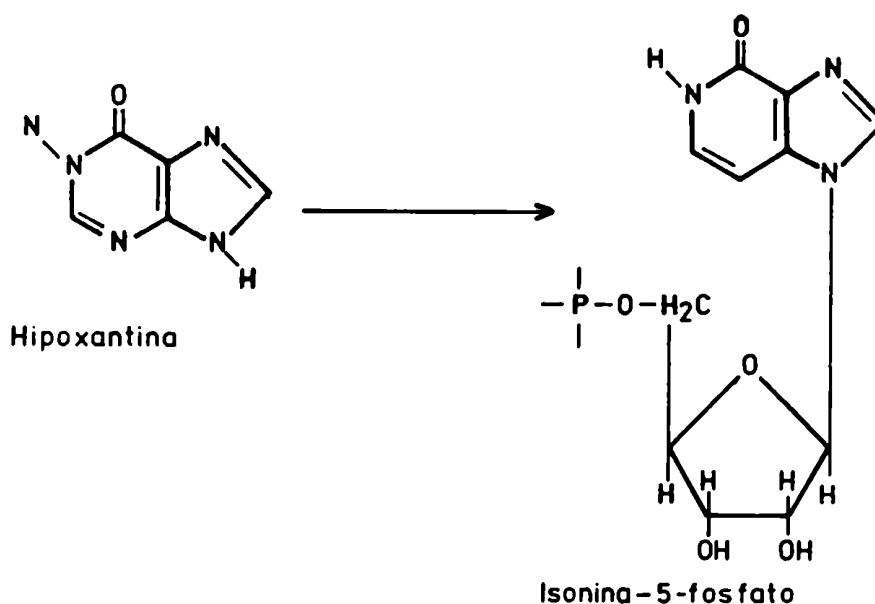


Figura 17.3. Vfa de rescate para la síntesis de purinas.

Durante el período de selección, los híbridos se dividirán y el número de células irá aumentando paulatinamente. Si los núcleos se fusionan durante o posteriormente a la división mitótica, estos tendrán un gran número de cromosomas, los cuales serán imposibles de mantener. Luego de las divisiones mitóticas, los cromosomas se excluirán de los nuevos núcleos hacia el citoplasma para ser destruidos. El número de cromosomas irá disminuyendo desde los aproximadamente 112 que posee al principio (72 del mieloma y 40 del linfocito B) hasta llegar a un número estable de 70-80. Como consecuencia de esta exclusión, muchas células pierden características esenciales además de perder viabilidad o no secretar anticuerpos. Pero algunas de las células conservan los cromosomas.

somas responsables de la viabilidad y secreción y son ellas las iniciadoras de una nueva línea celular híbrida con características de crecimiento maligno. Ellas serán los hibridomas.

M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S

## I. *Neurospora crassa*

### I-1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

La cepa utilizada en la mayoría de los experimentos fue la tipo salvaje St. Lawrence 74 (st.L. 74). Se usó también la mutante "slime", cepa FGSC N°1118 (197). El uso de esta mutante presenta una ventaja fundamental, crece como "protoplastos" aislados rodeados por una membrana plasmática, con ausencia de pared celular, característica de la cepa salvaje de *Neurospora*.

La cepa salvaje se cultivó en medio de Vogel (198) suplementado con sacarosa al 2%(P/V) y 2,5  $\mu$ l/ml de biotina. Los cultivos se desarrollaron con agitación rotatoria (100rpm) a 30°C, durante 40 horas, en frascos de Erlenmeyer de 2.000 ml conteniendo 500 ml de medio. Los cultivos se cosecharon por filtración en un embudo Bücher con vacfo, lavando con 500 ml de agua destilada frfa. A continuación, el material se congeló a -20°C y liofilizó.

Los cultivos de la mutante "slime" se realizaron de acuerdo a Woodward y Woodward (199), en los cuales el medio mínimo de Vogel contiene los siguientes agregados: 2% de sacarosa, 0,75% de caldo de nutrientes, 0,75% de extracto de levadura y 2,5  $\mu$ l/ml de biotina. El crecimiento se llevó a cabo a 30°C durante 48-60 horas con agitación rotatoria (100 rpm).

### I-2. Homogeneización y Fraccionamiento.

El material liofilizado se pulverizó en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El polvo obtenido se trasladó a un vaso de precipitado, donde se homogeneizó con un equipo Ultra Turrax (desintegrador de tejidos, modelo T 18/10,

IKA), durante 1 minuto a máxima velocidad; esta operación se repitió dos veces más. Seguidamente se dejó evaporar el nitrógeno y se resuspendió el material en TRIS-HCL 50 mM, pH:7,5 (tampón A) conteniendo PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 5 mM. La cantidad de tampón A agregada fue de 20 ml por gramo de micelio seco. El material fue nuevamente homogeneizado con Ultra Turrax. El extracto fue centrifugado a 1.100 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante de esta última centrifugación fue centrifugado a 105.000 x g durante 120 minutos. Este último sobrenadante fue denominado S105 y constituye la fracción soluble del micelio a partir de la cual se realizaron los sucesivos pasos de purificación de la adenil ciclasa.

Las células obtenidas de los cultivos de la mutante se colectaron por centrifugación a 900 x g por 7 minutos. El precipitado celular se resuspendió en una cantidad de NaHCO<sub>3</sub> 1mM igual a la décima parte del volumen total del cultivo, se dejó 30 minutos en frío. En este nivel, a la preparación se la llamó "lisado". Esta suspensión se centrifugó por 15 minutos a 15.000 x g y el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 105.000 x g por 60 minutos. El precipitado logrado constituye la fracción que denominamos "membranas crudas", esta fracción fue resuspendida en NaHCO<sub>3</sub> 1mM y usada como fuente de enzima.

## II. Trypanosoma cruzi.

### II-1. Cepa utilizada y condiciones de cultivo.

La cepa utilizada fue la llamada Tul 2, porque deriva de la cepa Tulahuén, que fue mantenida por inoculación



en ratas hasta 1979 y en cultivo hasta el presente (200). Esta cepa sigue conservando su infectividad.

El estadio del parásito utilizado en los experimentos, es el epimastigote. Las células fueron crecidas a 30°C en un medio bifásico completo (201), sin agitación en Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio con agar y 5 ml de medio líquido. Los parásitos que crecen en la superficie y son cosechados en la fase logarítmica de crecimiento (7 días), se centrifugaron a 1.000 x g por 15 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con una solución que contenía sacarosa 0,25 M y KCl 5mM (SKS).

## II-2. Homogeneización y Fraccionamiento.

Los parásitos fueron resuspendidos en TRIS-HCL 50mM, conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM, en una relación de 100 mg de células (peso húmedo) por 1 ml de tampón e inmediatamente se sometieron a la ruptura. Esta se llevó a cabo en un desintegrador Sorvall-Ribi, por presión y descompresión a 350 kg/cm<sup>2</sup> (5.000 psi), en atmósfera de nitrógeno. La ruptura se comprobó en un microscopio óptico.

El homogenato fue centrifugado a 1.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 5.000 x g por 15 minutos a 4°C. Luego se centrifugó a 11.500 x g durante 10 minutos y a 30.000 x g por 30 minutos. Finalmente, al sobrenadante se lo sometió a una ultracentrifugación a 105.000 x g por 150 minutos a 4°C.

A cada una de las fracciones se les midió la actividad de adenil ciclasa para determinar la localización de la enzima.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, posteriormente se utilizó como fuente de enzima las fracciones correspondientes a membrana plasmática.

III. Preparación del sustrato radioactivo de la adenil ciclasa[ $\alpha$ <sup>32</sup>P]ATP.

El método de ensayo de la adenil ciclasa usado en esta tesis, se basa en la cuantificación del AMPc "marcado" radioactivamente con <sup>32</sup>P, a partir de ATP(<sup>32</sup>P) marcado en posición  $\alpha$ , ya que este es el único fosfato que se conserva en la molécula del producto, luego de la catálisis enzimática (figura 18):



Figura 18.

La síntesis del  $[\alpha^{32}P]ATP$ , se realizó por el método descrito por Flawiá y Torres (202). Este procedimiento involucra dos pasos:

- 1- Síntesis química del  $[\alpha^{32}P]AMP$ , que implica la esterificación del  $^{32}PO_4H_3$  con el oxhidrilo en posición 5' de la isopro-

isopropilidén-adenosina (figura 19), seguida de una hidrólisis ácida del grupo isopropilideno, para obtener 5'AMP marcado con  $^{32}\text{P}$ .

2- Síntesis enzimática del  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; utilizando como material de partida el producto de la síntesis química, se efectúan simultáneamente las siguientes reacciones enzimáticas.

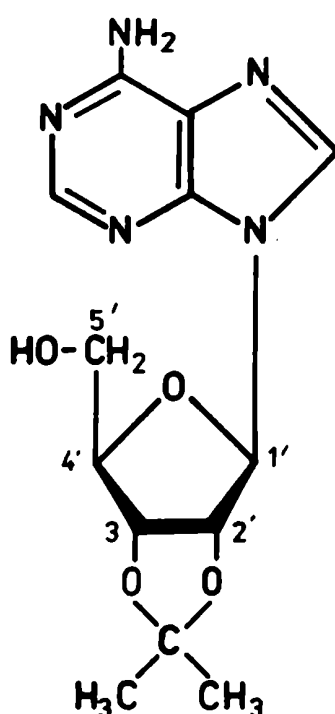
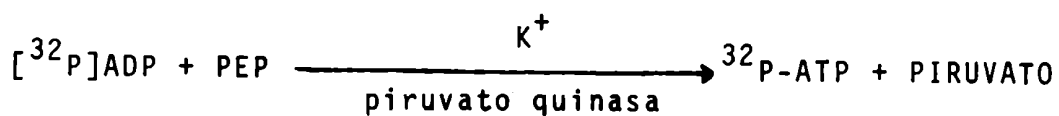
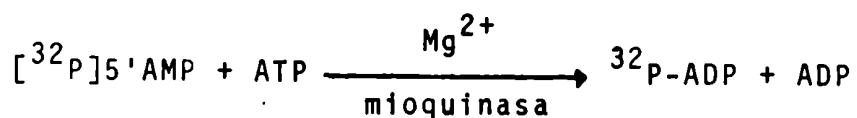


Figura 19. Isopropilidén-adenosina

Se procedió de la siguiente manera:

La solución clorhídrica de fosfato inorgánico radioactivo (50 mCi) se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. El sedimento se resuspendió en 4 ml de agua destilada, agregándose 5  $\mu$ moles de fosfato inorgánico "frío". Volvió a evaporarse a sequedad y a resuspenderse el sedimento en 4 ml de agua. Este procedimiento se repitió 3 veces con el objeto de eliminar por completo el ácido clorhídrico en que viene disuelto el  $^{32}\text{P}$ . Al sedimento de la última evaporación se le agregaron 60 mg de isopropilidén-adenosina y se secó con acetonitrilo en línea de vacío según Greenless y Symons (203).

El sedimento se resuspendió en 4-5 ml de acetonitrilo y se evaporó nuevamente a sequedad. Este procedimiento se repitió 3 veces más. Una vez que la preparación estuvo totalmente seca, se realizó la síntesis química: Se preparó una mezcla de 3,2 ml de dimetil-sulfóxido (solvente), 20  $\mu$ l de tricloro-acetonitrilo (agente condensante) y 25  $\mu$ l de trietilamina (catalizador). Se agregó rápidamente la mezcla al balón de reacción que contenía el  $^{32}\text{P}_i$  y la isopropilidén-adenosina, se tapó herméticamente y se incubó a 37°C durante 15-20 minutos. A continuación se le agregaron 6 ml de ácido acético 5 N y se calentó en baño de agua a 100°C, con el balón destapado, durante 1 hora (hidrólisis). Al cabo de ese tiempo, el contenido del balón se evaporó a sequedad, se resuspendió en 3 ml de agua y se evaporó nuevamente. Este procedimiento se repitió 4 veces.

Síntesis enzimática: El sedimento de la última evaporación ( $^{32}\text{P}$ ]5'AMP) fue incubado durante 20 minutos a 37°C en una mezcla de la siguiente composición:

tampón TRIS-HCL	100mM pH:7,4
MgCl <sub>2</sub>	15mM
KCl	100mM
ATP	0,16mM
PEP	7,5mM
Piruvato quinasa	20µg/ml
Mioquinasa	200µg/ml

El volumen total fue de 3,2 ml y la reacción se detuvo por el agregado de 3 ml de metanol, calentando luego en baño de agua a 100°C, durante 3 minutos.

Después de finalizada la síntesis enzimática, el contenido del balón fue sembrado en una columna de DEAE-Sefadex A-25 (1x9 cm) forma bicarbonato, previamente lavada y equilibrada con agua destilada. Una vez que la muestra penetró en la columna cromatográfica, se eluyó con un gradiente continuo de bicarbonato de trietil-amina pH:7,5, de 0 a 1 M (volumen total de gradiente 200 ml). Se recogieron fracciones de 7-8 ml y la presencia de radioactividad en cada fracción fue estimada semicuantitativamente, mediante el uso de un detector tipo Geiger-Müller. En la figura 20 se muestra un perfil típico del eluido de la columna de DEAE-Sefadex A-25.

Se juntaron las fracciones correspondientes al pico de ATP y se evaporó a sequedad en el evaporador rotatorio. El residuo se retomó en 5 ml de metanol, se evaporó nuevamente y por último se resuspendió el sedimento en un volumen apropiado de agua destilada (generalmente de 1 a 4 ml).

La caracterización del ATP radioactivo se realizó por cromatografía ascendente en hojas de polietilén-imino-celulosa, conteniendo reactivo fluorescente, usando como solvente cloruro de litio 1,5M. La posición de los nucleótidos utilizados como patrones (ATP, ADP, AMP) fue detectada bajo luz U.V., emitida por una fuente marca Mineralight.

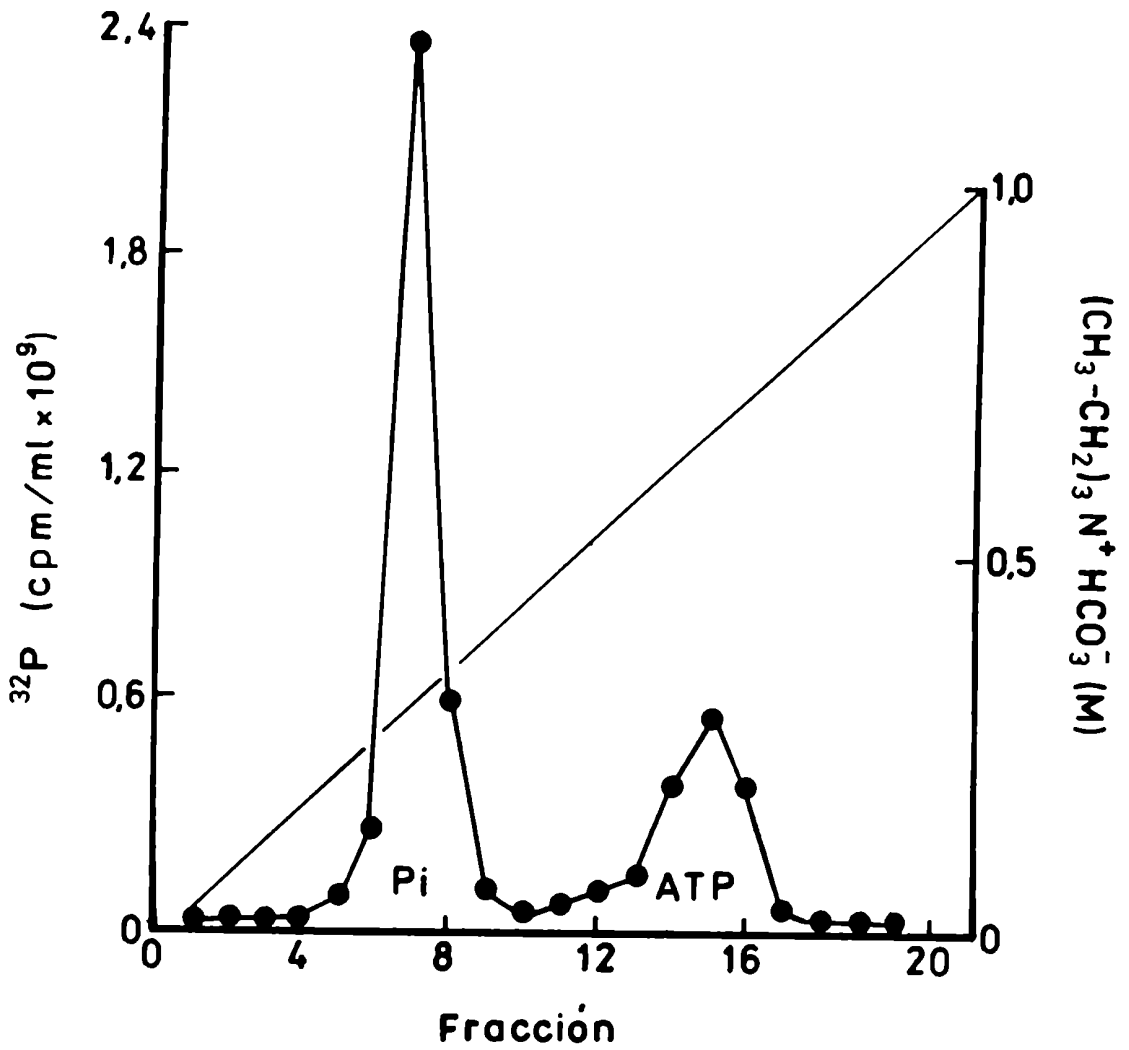


Figura 20. Perfil de elución de una cromatografía en DEAE-Sefadex A-25, correspondiente a la mezcla de reacción después de la síntesis enzimática para la obtención de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ . Se estima la radioactividad en cada fracción semicuantitativamente con un monitor (●).

#### IV. Ensayo de la actividad de adenil ciclasa.

Composición de la mezcla de incubación: tampón TRIS-HCL 50mM pH:7,5, 3-isobutil-1-metilxantina 0,2 mM, AMP cíclico 1mM,  $Cl_2Mn$  o  $Cl_2Mg$  2mM, fosfocreatina 2mM, [ $\alpha^{32}P$ ]ATP 0,5mM (con una actividad específica que varía entre 50 y 200 cpm por pmol) y fracción enzimática (50-200 $\mu$ g proteína). El volumen total fue 0,1 ml y las incubaciones se realizaron a 37°C por 3 a 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de una solución que contiene ATP 40mM, [ $^3H$ ]AMPc 12,5 mM (actividad específica 3.000 cpm por mol) y calentamiento durante 3 minutos en baño de agua a 100°C (204).

El AMP cíclico formado fue purificado siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas Dowex-50 y Alúmina, descrito por Solomon et al (205). La base del método consiste en separar el AMPc radioactivo de los otros nucleótidos (ATP, ADP, AMP), del Pi y del Ppi a través de una resina intercambiadora de cationes (DOWEX-50), los  $H^+$  de la resina se intercambian con los  $-NH_2^+$  de la adenina. El AMPc es el único compuesto de fosfato parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la Dowex 50, el AMPc es adicionalmente purificado en una columna de alúmina que retiene a todos los fosfatos que pudieran aún, estar contaminando al nucleótido cíclico. En esta columna el AMP cíclico no se retiene a pH neutro.

Los pasos de purificación del AMP cíclico se detallan a continuación:

Una vez detenida la reacción enzimática, se agrega 1 ml de agua destilada a la muestra y se siembra en una columna de DOWEX AG-50W-X4 (200-400 mesh) forma  $H^+$  de 4 cm de largo por 0,5 cm de diámetro interno. Luego del pasaje de la mues-

tra, se lavó con 5 ml de agua destilada en dos etapas, una de un ml y otra de cuatro ml, descartándose los eluidos. Después se pasaron 6 ml de agua, recogiendo el eluido directamente sobre una columna de alúmina neutra (3 x 0,5 cm) previamente equilibrada con Imidazol-HCL 0,1M pH:7,5. Una vez pasados los 6 ml por la columna de alúmina, y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se lava la columna con 1 ml del tampón de equilibrado y luego con 4 ml del mismo tampón, recogiendo este último eluido en frascos de centelleo líquido. La radioactividad se midió según el método de Bray (206), añadiendo a los frascos 13,5 ml de la mezcla centelladora.

Las lecturas se realizaron en un contador de centelleo Beckman LS-8100, utilizando el programa 6 del mismo, con lectura para  $^3\text{H}$  y  $^{32}\text{P}$ . El AMP cíclico tritiado, agregado al finalizar la incubación, permite calcular el porcentaje de recuperación del AMPc luego del pasaje por las columnas.

#### V. Preparación de hexil amino-sefarosa.

En la preparación de hexil-amino-sefarosa, que se usó en uno de los pasos de purificación de la adenil ciclasa de Neurospora crassa y Trypanosoma cruzi, se siguió el método descrito por Cuatrecasas (207).

A 50 g de sefarosa-4B, previamente lavada con agua destilada, se la resuspendió en 50 ml de agua. A dicha suspensión se lo sometió a agitación magnética en baño de hielo, se le agregó 50 ml de una solución de BrCN (0,2g/ml), manteniéndose el pH en 11, con el agregado de NaOH 4N. Una vez estabilizado el pH, se filtró la resina con vacío en un embudo Büchner y se lavó con 500 ml de agua destilada y 500 ml de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  0,1M, ambos a 4°C. Luego, la resina se trasvasó a un vaso de precipitado, conteniendo 80 ml de una solución de



1,6 diamino-hexano en  $\text{NaCO}_3\text{H}$  1M (0,15 g/ml), llevado previamente a pH:8 con HCl concentrado. Esta suspensión se mantuvo con agitación magnética a 4°C durante 16-20 horas. Al término de dicho tiempo, se lavó la resina con aproximadamente 1.000 ml de agua destilada, se resuspendió en etanolamina 1M, manteniendo la agitación magnética a 4°C por 2-3 horas.

Finalmente la resina fue filtrada y lavada exhaustivamente con agua destilada.

#### VI. Solubilización de la adenil ciclasa de T. cruzi.

Se resuspendieron 10 g de Trypanosoma cruzi, cepa Tulahuén 2, en TRIS-HCl 50 mM pH:7,5 (tampón A), conteniendo 2-mercaptoetanol 1mM. La ruptura y fraccionamiento posterior se realizaron tal como se especificó en el apartado II-2 de esta sección de "Materiales y Métodos".

La fracción  $P_{105}$  obtenida, fue resuspendida en TRIS-HCl 50 mM pH:7,5, 2-mercaptoetanol 1 mM, Lubrol PX 0,1% (detergente no iónico) y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5M, esto constituye el tampón de extracción. La suspensión de membranas fue sometida a agitación magnética durante 60 minutos a 0°C. Al cabo de dicho tiempo se centrifugó a 105.000 x g por 60 minutos. El  $P_{105}$  extraído se resuspendió en tampón A y se midió en ambas fracciones la actividad de adenil ciclasa. El sobrenadante de 105.000 x g ( $S_{105}$ ) del homogenato obtenido en presencia del tampón de extracción constituyó la fracción solubilizada de la enzima, la cual se sometió a los pasos de purificación que se detallan a continuación.

## VII. Purificación parcial de la adenil ciclasa de T. cruzi.

La fracción S<sub>105</sub> obtenida de la extracción, se dializó durante una noche a 4°C contra 50 volúmenes de una solución de TRIS-HCL 50 mM pH:7,5, 2 mercaptoetanol 1 mM (tampón B), conteniendo Lubrol PX 0,1% (tampón C).

### VII-1. Cromatografía en hexilamino-sefarosa.

La fracción S<sub>105</sub> dializada (10 ml, 4 mg proteína/ml) se sembró en una columna de Hexilamino-sefarosa, preparada tal como se especifica en el apartado V de este capítulo, el lecho de resina fue de 1 x 15 cm y se equilibró con tampón B. Luego de aplicar la muestra en la columna, se lavó con 20 ml de tampón de equilibrio y se eluyó por pasos, es decir aplicando tampón C conteniendo concentraciones crecientes de ClNa, a saber 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5 y 1 M. El volumen total del tampón eluyente fue de 50 ml; se recogieron fracciones de 1 ml con un flujo de elución de 0,5 ml por minuto. Las fracciones que contenían actividad de adenil ciclasa se reunieron y constituyeron la fracción de Hexilamino-sefarosa.

### VII-2. Enfoque isoeléctrico en columna.

Se utilizó una columna marca LKB de 110 ml de capacidad. Los enfoques isoeléctricos fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones del manual del uso provisto por LKB. En todos los casos el medio estabilizante del gradiente de anfolitos fue sacarosa.

Enfoque isoeléctrico en el rango de pH:5-8. Concentración final de anfolitos en la columna 1%.

Polaridad: Anodo en la parte inferior de la columna.

Composición de la solución anódica: Sacarosa, 15 g; H<sub>2</sub>O, 12 ml

y ácido ortofosfórico 1M, 4 ml.

Composición de la solución catódica: NaOH 0,25 M, 10 ml.

El gradiente de sacarosa y anfolitos se realizó a partir de las siguientes soluciones:

Solución densa, sacarosa 27 g, H<sub>2</sub>O 33 ml, anfolitos (solución al 40% P/V del rango de pH:5-8), 2 ml y de muestra 2 ml (fracción de Hexilamino-sefarosa).

Solución diluída, sacarosa 2,7 g, H<sub>2</sub>O, 46,3 ml, anfolitos (solución al 40% P/V del rango de pH de 5 a 8), 0,7 ml.

En caso que el electroenfoque tuviera fines analíticos, la composición de las soluciones fue:

Solución densa, sacarosa 27 g, H<sub>2</sub>O 35 ml y anfolitos 2 ml de solución al 40% P/V.

Solución diluída, sacarosa 2,7 g, H<sub>2</sub>O, 52,3 ml y anfolitos 0,7 ml de solución al 40% P/V (X).

Una vez formado el gradiente de sacarosa se realizó la corrida a una potencia constante de 5W durante 20 horas, manteniendo el sistema refrigerado a 4°C. La intensidad de corriente y el voltaje inicial fueron 7 mA y 700 V respectivamente. La intensidad final fue 2 mA y el voltaje final 1.800 V. Al dar por finalizada la corrida, el contenido de la columna fue fraccionado por medio de una bomba peristáltica en alícuotas de 2 ml. El pH de las fracciones fue medido a 4°C.

(X) Cuando se formó el gradiente, se realizó un preenfoco de los anfolitos, durante 6 horas a 1.600 V y 2 mA y pasado ese lapso se retiró del centro de la columna, un volúmen del contenido igual al volúmen de la muestra a sembrar (1 ml) por medio de una bomba peristáltica LKB. Se ajustó la concentración de la muestra por agregado de sacarosa sólida y se la introdujo en la zona central del gradiente.

VIII. Caracterización molecular de la adenil ciclasa de T.cruzi.

VIII-1. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Los gradientes de sacarosa de 5 a 20% P/V se prepararon en agua y óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O), conteniendo TRIS-HCl 50 mM pH:7,5, 2-mercaptoetanol 1mM, NaCl 0,15 M y Lubrol PX 0,1%. Los gradientes fueron preparados en tubos de acetato de celulosa (1,2 x 5 cm) y fueron sembrados 0,2 ml de una mezcla que contenía la preparación enzimática y las siguientes proteínas marcadoras: catalasa de hígado bovino (0,1 mg/ml), malato deshidrogenasa de corazón porcino (0,01 mg/ml), lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (0,03 mg/ml) y citocromo C de corazón de caballo (2 mg/ml). Las centrifugaciones se realizaron en el rotor SW60 de Beckman, a 40.000 rpm durante 18 horas a 4°C. Finalizada la corrida se colectaron fracciones de 0,2 ml, succionando desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica, a una velocidad de 1 ml/min.

VIII-2. Filtración en geles de agarosa.

La filtración se realizó en una columna de Bio-Gel A-5m de dimensiones analíticas (0,9 x 75 cm) equilibrada con tampón C. La muestra sembrada fue una fracción de Hexil amino-sefarosa (0,8 ml, 0,45 mg/ml) y se eluyó con el mismo tampón, a una velocidad de 0,8 ml/min. La temperatura se mantuvo a 4°C y las fracciones fueron de 1 ml. Las proteínas marcadoras fueron cromatografiadas en forma individual en la misma columna. Dichas proteínas fueron  $\beta$ -galactosidasa de Escherichia coli (0,05 mg/ml), fumarasa de corazón porcino (0,025 mg/ml), malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y citocromo C, como se indicó en la sección VIII-1 de este capítulo. El volumen de exclusión fue determinado usando

una suspensión de Rhizobium meliloti conteniendo  $6 \times 10^8$  bacterias/ml, siguiendo absorbancia a 660 nm.

VIII-3. Determinación de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel.

Citocromo C: se midió su absorción en 410 nm (banda de Soret)

Malato deshidrogenasa: la activación se detectó por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (208).

Lactato deshidrogenasa: su actividad se determinó por el consumo de NADH, en presencia de piruvato, del mismo modo que para malato deshidrogenasa.

Fumarasa: se midió su actividad por la formación de fumarato, que absorbe a 240 nm, en presencia de L-málico (209)

Catalasa: La disminución de la oxidación de yoduro a yodo, acoplada a la reducción del  $H_2O_2$  por la enzima, permitió medir su actividad (210).

$\beta$ -galactosidasa: se valoró utilizando o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido como sustrato (208).

IX. Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos.

IX-1. Volumen específico parcial.

El método usado fue desarrollado por Clarke (211) y Meunier et al (212) para determinar el volumen específico parcial de complejos de proteína-detergente, mediante el análisis de los coeficientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en  $H_2O$  y  $D_2O$ . La base del método fue descrito por Edelstein y Schachman (213) y consiste en el cambio

en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución por el uso de D<sub>2</sub>O.

De acuerdo con el trabajo de Martin y Ames (214), la distancia  $r_i$  recorrida desde el origen por cualquier macromolécula sometida a ultracentrifugación en un medio  $i$  ( $i$ : H para H<sub>2</sub>O e  $i$ : D para D<sub>2</sub>O) es:

$$r_i = k_i S_{20,w} (1 - \bar{v} \rho_i) \quad (1)$$

donde  $k_i$  es una constante en un medio, a una dada densidad para cualquier macromolécula con el mismo volumen específico parcial;  $S_{20,w}$  es el coeficiente de sedimentación de la macromolécula determinado en agua a 20°C;  $\bar{v}$  es el volumen específico parcial y  $\rho_i$  es la densidad del medio  $i$ . Dado que la densidad  $\rho_i$  aumenta linealmente a lo largo del gradiente de sacarosa, se hace una estimación promediada de ese parámetro tomando su valor a  $r_i/2$ . Bajo estas condiciones, el error en  $\rho_i$  es menor que el 0,5%. Entonces dados dos gradientes de sacarosa realizados en H<sub>2</sub>O y en D<sub>2</sub>O, resulta:

$$\frac{r_H}{r_D} = \frac{k_H(1 - \bar{v} \rho_H)}{k_D(1 - \bar{v} \rho_D)} \quad (2)$$

Siendo entonces:

$$\bar{v} = \frac{r_H k_D - r_D k_H}{r_H k_D \rho_D - r_D k_H \rho_H} \quad (3)$$

Dividiendo al numerador y al denominador del segundo término de la igualdad (3) por  $r_D k_D$ , resulta:

$$v = \frac{\frac{r_H k_D}{r_D k_H} - 1}{\frac{r_H k_D \rho_D}{r_D k_H} - \rho_H} \quad (4)$$

Por otro lado, la ecuación (2) puede plantearse así:

$$\frac{r_H k_D}{r_D k_H} = \frac{(1 - \bar{v} \rho_H)}{(1 - \bar{v} \rho_D)} \quad (5)$$

y según la ecuación de Svedberg:

$$\frac{(1 - \bar{v} \rho_H)}{(1 - \bar{v} \rho_D)} = \frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \quad (6)$$

donde  $S_H$  y  $S_D$  son los coeficientes de sedimentación aparentes determinados experimentalmente en  $H_2O$  y  $D_2O$  respectivamente, y  $\eta_H$  y  $\eta_D$  las viscosidades de las soluciones en  $H_2O$  y  $D_2O$  respectivamente, en la zona en que se ubica la macromolécula analizada.

De las ecuaciones (4), (5) y (6) es entonces:

$$\bar{v} = \frac{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} - 1}{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \rho_D - 1} \quad (7)$$

La ecuación (7) fue utilizada para calcular el  $\bar{v}$  de la adenil ciclasa  $S_H$ ,  $S_D$ ,  $\eta_H$  y  $\eta_D$  fueron obtenidos a partir de la comparación de la movilidad de la adenil ciclasa con respecto a la de las proteínas marcadoras utilizadas, en los gradientes de sacarosa en  $H_2O$  y  $D_2O$  y cuyos valores numéricos serán presentados en el capítulo "Resultados y Discusión".

Las densidades  $\rho_D$  y  $\rho_H$  fueron determinadas por gravimetría, utilizando una micropipeta de 50  $\mu$ l.

#### IX-2. Radio de Stokes.

El valor del radio de Stokes ( $a$ ) fue obtenido a partir del perfil de las filtraciones en geles de agarosa (Bio-Gel). El valor fue estimado de un gráfico de  $a$  vs  $V_e/V_o$  (volumen de elución normalizado respecto del volumen de exclusión), obtenido con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

#### IX-3. Peso molecular.

El peso molecular de la adenil ciclasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (215):

$$M = \frac{6 \pi N \eta_{20,w}}{1 - \bar{v} \rho_{20,w}} \cdot a \cdot S_{20,w}$$

Siendo  $N$ , el número de Avogadro;  $\eta_{20,w}$ , viscosidad del agua a 20°C ( $1,100 \cdot 10^{-2}$  g/cm seg);  $a$ , radio de Stokes;  $S_{20,w}$ , coeficiente de sedimentación a 20°C en agua;  $\bar{v}$ , volumen específico parcial;  $\rho_{20,w}$ , densidad del agua a 20°C ( $0,9888$  cm<sup>3</sup>/g).

#### IX-4. Coefficiente friccional.

El coeficiente friccional fue calculado utilizando



los parámetros moleculares previamente obtenidos ( $\bar{v}$ ,  $a$ ,  $M$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = a \cdot \left( \frac{4\pi N}{3M\bar{v}} \right)^{1/3}$$

Siendo  $f$  el coeficiente de fricción de la proteína y  $f_0$ , el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

IX-5. Parámetros de las proteínas marcadoras.

En base a los datos recopilados por Haga et al (35) fue confeccionada la tabla IV con los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras que se utilizaron para la calibración en gradientes y cromatografías en geles de agarosa.

	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	VOLUMEN ESPECIFICO PARCIAL	RADIO DE STOKES	PESO MOLECULAR
	$S_{20.W}$	$\bar{v}$	$a$	PM
PROTEINA	(S)	(ml/g)	(nm)	
$\beta$ -Galactosidasa	15.9	0.76	6.84	520.000
Catalasa	11.3	0.73	5.21	247.000
Fumarasa	8.95	0.738	5.29	194.000
Lactato Deshidrogenasa	7.3	0.74	4.75	142.000
Malato Deshidrogenasa	4.3	0.74	3.69	70.000
Citocromo C	1.7	0.73	1.87	13.300

Tabla IV: Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas moleculares.

X. Purificación parcial de la adenil ciclasa de Neurospora crassa.

Se homogeneizaron 50g de micelio liofilizado en 1000 ml de tampón A, conteniendo EDTA 0,5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, ClNa 0,5 M y glicerol 5% (V/V). La homogeneización y el fraccionamiento posterior se realizaron tal como se especificó en el apartado I-1 de "Materiales y Métodos".

La fracción S<sub>105</sub> obtenida, se dializó 18 horas a 4°C contra 50 volúmenes de tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y glicerol 5% (V/V).

X-1. Cromatografía en Hexilamino-sefarosa.

Se sembraron 1.000 ml de la fracción S<sub>105</sub> dializada (3 mg proteína/ml) en una columna de hexilamino-sefarosa (3 x 20 cm), preparada como se especificó en el apartado VII-1 de "Materiales y Métodos" y equilibrada con tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. La columna fue lavada con 500 ml de tampón de equilibrado y elufda con un gradiente lineal de ClNa en tampón A conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM, donde la concentración de la sal varió de 0 a 0,7 M. El volumen total del gradiente fue de 1.000 ml y se recogieron fracciones de 25 ml a una velocidad de 2 ml/minuto. Las fracciones que tenían actividad de adenil ciclasa, fueron combinadas, constituyendo la preparación de hexilamino-sefarosa.

X-2. Filtración en gel de agarosa.

La preparación de hexilamino-sefarosa, se concentró por ultrafiltración utilizando una membrana Amicon UM30, hasta un volumen de 7 ml (25 mg proteína/ml) y se sembró en una columna Bio-Gel A-5m (100-200 mesh) (intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares: 10.000-5.000.000) de 2,5 x 87 cm

y equilibrada con tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM. La elución se realizó con el mismo tampón de equilibrado. Se recogieron fracciones de 7 ml a una velocidad de 2,5 ml/minuto. Las fracciones de mayor actividad específica se combinaron constituyendo la preparación de Bio-Gel.

XI. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes.

Se realizaron geles planos polimerizados en una celda marca Bio-Rad, modelo 220.

Dimensiones del gel separador: 8 cm de alto x 1,5 mm de espesor. Composición del gel separador: acrilamida, 10% (P/V); bisacrilamida, 0,27% (P/V); SDS, 0,1% (P/V); TRIS-ClH 0,375 M pH: 8,8; TEMED, 0,025% (V/V) y persulfato de amonio (PSA) 0,033% (P/V). Dimensiones del gel concentrador: 1,5 cm de alto x 1,5 mm de espesor; ancho de cada canal, 8 mm.

Composición del gel concentrador: acrilamida, 5% (P/V); bisacrilamida, 0,13% (P/V); SDS, 0,1% (P/V); TRIS-ClH 0,125M pH: 6,8; TEMED, 0,05% (V/V) y PSA, 0,1% (P/V).

Preparación de la muestra y electroforesis: antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras fueron dializadas 14-16 horas a 4°C, contra TRIS-ClH 10 mM pH: 7,5 y posteriormente fueron liofilizadas. Luego se resuspendieron en 50-75 µl de una mezcla desnaturizante de la siguiente composición:

SDS, 2% (P/V); 2-mercaptoetanol, 5% (V/V); glicerol, 20% (V/V); TRIS-ClH 0,06 M pH:6,8 y azul de bromofenol, 0,002% (P/V). Las muestras fueron calentadas durante 3 minutos en baño de agua a 100°C. El volumen de la muestra aplicada en cada canal fue de 50 µl, conteniendo entre 10 y 100 µg de proteína. El tampón de corrida fue TRIS-GLICINA 50 mM pH: 8,0, conteniendo SDS 0,1% (P/V). La electroforesis fue realizada a una intensidad de co-

corriente constante de 25 mA, durante 4-5 horas, manteniendo la temperatura a 15°C. Las proteínas para la calibración de los pesos moleculares fueron: fosforilasa b (músculo de conejo), albúmina (suero bovino), ovoalbúmina (clara de huevo), anhidrasa carbónica (eritrocito bovino) e inhibidor de tripsina (soja). Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo, durante 2 horas a 37°C en una solución acuosa que contenía metanol 25% (V/V), ácido acético 8% (V/V) y azul de Coomassie G o R 250 0,2% (P/V). El desteñido se hizo con la misma solución pero sin colorante.

Cuando la concentración de proteínas en el gel no se detectaba, se utilizaba la tinción con  $\text{NO}_3\text{Ag}$ , según el método descrito por Oakley (217).

## XII. Preparación de adenil ciclasa soluble de testículo de rata.

Se utilizaron ratas machos Wistar de 45 a 90 días de edad con un peso promedio entre 200 y 250 g. los animales fueron sacrificados por decapitación. Luego se extrajeron los testículos e inmediatamente se practicó una incisión en la superficie de los mismos, depositando los tubos seminíferos en un vaso de precipitado sumergido en baño de hielo y eliminando la cápsula testicular. El material fue homogeneizado tres volúmenes de tampón A, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 0,5 mM, usando un desintegrador de tejidos modelo SDT (Tekman Co.). Esta operación y las siguientes se realizaron a 4°C. El homogenato se centrifugó a 7.700 x g por 10 minutos en una centrífuga refrigerada marca Sorvall, modelo RC 5-B, usando el rotor SS-34. El sobrenadante de esta centrifugación (que contiene la mayor proporción de actividad de adenil ciclasa), se denominó preparación cruda, la cual fue sometida a una ultra-

centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos en una centrifuga marca Beckman modelo L5-50, utilizando el rotor 50Ti. El sobrenadante de esta ultracentrifugación fue llamado S<sub>105</sub> y constituyó la fracción soluble de la adenil ciclasa de testículo.

### XIII. Preparación de membranas de hígado de rata.

Las membranas plasmáticas de células hepáticas yuxtapuestas que forman los canalículos biliares, se aislaron por el procedimiento de Neville (21). Se utilizaron para ello 4 ratas de 200 grs de peso aproximado, a las cuales se decapitó. Se extrajeron los hígados y se los limpió del tejido conectivo y vasos. Se los cortó con tijeras en pequeños trozos y se los enfrió en un vaso de precipitado sobre hielo. Utilizando un homogeneizador "Dounce" se homogeneizaron porciones de 10 grs del tejido con 25 ml de una solución de CO<sub>3</sub>HNa 1 mM, utilizando el émbolo flojo (8 golpes de pistón). Los homogeneizados se agitaron con 500 ml de CO<sub>3</sub>HNa 1 mM frío por 3 minutos y filtraron por 4 capas de gasa hidrófila. El filtrado se centrifugó a 1.500 x g durante 10 minutos, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante (secando las paredes con papel de filtro) y los precipitados se pasaron nuevamente al homogeneizador, en el cual se le aplicaron 3 golpes de pistón flojo; esta operación se repitió 3-4 veces. En una probeta de 100 ml se colocaron 34 ml de sacarosa 69% (P/V), ajustada con refractómetro (Abbe) a 20°C y sobre ella se volcaron los precipitados y se agregó agua hasta completar los 60 ml; luego se ajustó la mezcla a 44% de sacarosa con el refractómetro, agregando agua o sacarosa 69% (P/V). De esta suspensión 40 ml fueron colocados en tubos del rotor SW 25,2 y sobre ella se agregó 20 ml de sacarosa 42,3% ± 0,1 (ajustada con refractómetro).

Luego se centrifugó a 65.000 x g durante 2 horas. La fracción de membranas se recuperó de la superficie del menisco con espátula; posteriormente se diluyó la sacarosa con  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM y se centrifugó a 105.000 x g en un rotor 50 Ti durante 30 minutos. El precipitado resultante se conservó a  $-70^\circ\text{C}$ .

XIII-1. Tratamiento con N-etil maleimida.

El tratamiento de las membranas de hígado de ratas con N-etil maleimida (NEM) se efectuó de la siguiente forma: Las membranas de hígado se resuspendieron en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM, a una concentración proteica de 4 mg/ml y se les agregó NEM disuelta en agua, de manera tal que su concentración final fuera 0,5 mM. El volumen total fue de 1 ml. La incubación se realizó a  $30^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se detuvo por el agregado de 6 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM frío, conteniendo ditioneitol (DTT) 5 mM. A continuación la mezcla se centrifugó a 105.000 x g durante 60 minutos. Luego, las membranas se resuspendieron en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM.

XIII-2. Tratamiento con toxina del cólera.

El procedimiento seguido en el tratamiento de las membranas con toxina del cólera fue el siguiente: La mezcla de reacción consistió en Hepes (N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2 ácido etanolsulfónico) 20 mM, pH: 8,2;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  2 mM (tampón B), DTT 1 mM, NAD 1 mM, ATP 1 mM, GTP 10  $\mu\text{M}$ , toxina del cólera 10  $\mu\text{g/ml}$  (pretratada con DTT 20 mM a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 minutos) y las membranas de hígado de rata. El volumen total fue de 2 ml. La incubación se llevó a cabo a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se detuvo por el agregado de 8 ml de tampón A frío. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 105.000

x g durante 60 minutos, resuspendiéndose luego en tampón B. Como control se trataron membranas en las mismas condiciones pero suprimiendo la toxina.

#### XIV. Preparación de membranas de eritrocitos de pavo.

El procedimiento seguido en la obtención de membranas de eritrocitos de pavo fue el siguiente: A un pavo se le extrajo sangre de la vena del ala; dicha sangre fue recibida en tubos que contenían heparina y se centrifugó a 120 x g durante 10 minutos, seguidamente se lavaron 4 veces las células sedimentadas con un volumen de TRIS-ClH 1 mM pH: 7,4, conteniendo ClNa 0,15 M y Cl<sub>2</sub>Mg 0,1 mM. Las células se resuspendieron en dos volúmenes de agua destilada fría y se homogeneizaron en un Dounce. Posteriormente se agregó deoxirribonucleasa I (40 ug/ml) y se incubó 20 minutos a 30°C. Finalmente, se centrifugó a 23.000 x g durante 30 minutos y las membranas sedimentadas se resuspendieron en tampón A, conteniendo DTT 1 mM y conservadas a -20°C.

#### XIV-1. Tratamiento con toxina del cólera.

El procedimiento es similar al seguido para las membranas de hígado de ratas (ver apartado XIII-2 de "Materiales y Métodos"). Para el marcado radioactivo de las membranas por ADP-ribosilación (Apartado II-4 de Introducción), se usó el mismo tratamiento con toxina del cólera al que se le adicionó 1 µl de [<sup>14</sup>C]NAD (5 µCi/ml). Lavando exhaustivamente las membranas con CO<sub>3</sub>HNa 1 mM antes de la resuspensión final.

#### XIV-2. Tratamiento con detergentes.

Tanto las membranas de eritrocitos tratadas como las

no tratadas con toxina del cólera, se resuspendieron en tampón B (5 mg proteína/ml) y se las sometió a agitación magnética a 0°C, añadiendo colato de sodio sólido hasta una concentración final de 1% (P/V), se continuó con la agitación durante 60 minutos, al cabo de la cual se centrifugó la suspensión a 20.000 x g por 60 minutos. Inmediatamente se incubó el sobrenadante a 23°C durante 20 minutos para inactivar la adenil ciclasa.

En forma paralela se trató membranas de eritrocitos de pavo con digitonina 1% (P/V), siguiendo el mismo protocolo anterior a excepción de la incubación a 23°C, la cual es innecesaria.

#### XIV-3. Cromatografía en Ultrogel.

Las membranas de eritrocitos de pavo que fueron marcadas con [<sup>14</sup>C]NAD y toxina del cólera según el apartado XIV-1 de "Materiales y Métodos", se trataron con digitonina 1% (P/V), luego de lo cual se obtuvo un sobrenadante de 20.000 x g. El mismo (1,5 ml, 7 mg proteína/ml) se sembró en una columna de Ultrogel Ac A 34 (intervalo de separación de proteínas globulares 20.000-350.000) de 1,25 x 58 cm equilibrada con TRIS-ClH 15 mM pH: 7,4, conteniendo EDTA 2 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 15 mM y digitonina 0,1%. Se eluyó con el mismo tampón de equilibrio, recogiendo fracciones de 4 ml a una velocidad de 0,8 ml/minuto.

Se tomaron 500 µl de cada fracción y se les midió la radioactividad en un contador Beckman modelo LS 8100, utilizando la mezcla de Bray. Además, se tomaron 30 µl de cada fracción y se les adicionó 5 µl de una suspensión de membranas de Neurospora crassa (12 mg proteína/ml) y se realizó reconstitución, tal como indica el apartado XIV-5 de "Materiales y Métodos".



XIV-4. Ensayo de unión (Binding) del [<sup>3</sup>H] dihidroalprenolol a receptores.

Se realizaron experimentos de medida de "Binding" tanto en membranas de eritrocito de pavo, como en los extractos de colato de N. crassa. De acuerdo al método de filtración en membranas de vidrio de Vauquelin et al (218).

Membranas: Se incubó [<sup>3</sup>H]dihidroalprenolol 23 mM a 30°C durante 30 minutos en una solución conteniendo TRIS-ClH 50 mM pH:7,5 Cl<sub>2</sub>Mg 15 mM con membranas de eritrocitos (0,1 a 0,4 mg proteína). El volumen total fue de 0,250 ml. Al final de la incubación se diluyeron alícuotas de 50 µl (por triplicado) con 4 ml de tampón A a 0°C. que contenía Cl<sub>2</sub>Mg 15 mM y filtrando bajo presión reducida a través de discos de fibra de vidrio (Whatman GF/F, 25 mm de diámetro). Los filtros fueron lavados con 6 ml de TRIS-ClH/Cl<sub>2</sub>Mg y posteriormente se colocan en viales de centelleo con 1 ml de ClH 1 M y 10 ml de Tritón/Tolueno (2:1). La radioactividad fue medida según se mencionó anteriormente. El "binding" inespecífico se determinó de la misma forma en mezclas conteniendo propranolol o L-alprenolol 10<sup>-5</sup>M.

Extractos de colato: Se incubó [<sup>3</sup>H] dihidroalprenolol 131 mM a 30°C durante 120 minutos en una solución conteniendo TRIS-ClH 50 mM pH:7,5 y 50 µl de extracto de detergente (0,03 a 0,13 mg proteína). El volumen total fue de 0,320 ml. El antagonista unido fue determinado por el descrito por Caron y Lefkowitz (219), según el cual al finalizar la incubación, las muestras fueron diluidas a 0,500 ml con tampón A y cromatografiadas en columnas de Sephadex G-50 (0,6 x 12 cm) a 4°C equilibradas con tampón A. Luego de sembrar las muestras, se pasaron 0,5 ml de tampón A y se descartó el eluido. Por último se agregaron 1,2 ml de tampón y se recogió directamente sobre viales de centelleo. La radioactividad se contó según el procedimiento mencionado anteriormente. El "binding" inespecífico fue determinado en presencia de propranolol o L-alprenolol 10<sup>-5</sup>M.

XIV-5. Ensayo de unión del  $[I^{125}]$  glucagón a receptores (250)

XV. Procedimiento para la reconstitución de la adenil ciclasa empleando componentes de diferentes sistemas biológicos.

Los experimentos de reconstitución de la adenil ciclasa se realizaron según el esquema presentado en la figura 21. Se utilizaron membranas de la cepa salvaje de Neurospora crassa obtenidas según el apartado I-1 de "Materiales y Métodos". El  $P_{105}$  obtenido fue resuspendido en tampón A conteniendo DTT 1 mM (8 mg proteína/ml) y se mezcló con extracto en detergente de las membranas de eritrocito de pavo (2,5 mg proteína/ml) (apartado XIV de "Materiales y Métodos"). Las mezclas se llevaron a un volumen final de 0,05 ml con tampón A conteniendo DTT 1 mM e incubaron a 23°C durante 20 minutos. Posteriormente se midió actividad de adenil ciclasa.

Los experimentos de reconstitución se realizaron también con membranas de otras cepas de N. crassa, tales como la FGSC 488, la cual posee una mutación cr-1. Con esta cepa se procedió en forma idéntica que con la cepa salvaje. Además se utilizaron preparaciones solubles de enzima de testículo de rata (apartado XII de "Materiales y Métodos").

XVI. Procedimiento para la fusión de membranas de diferentes orígenes biológicos para la obtención de una actividad de adenil ciclasa.

Para reconstituir un sistema de adenil ciclasa, a partir de membranas de diferentes especies fusionadas con PEG, se siguió el esquema diagramado en la figura 22 (220). Para ello, se emplearon membranas de T. cruzi obtenidas según el apar-

### ESQUEMA DE RECONSTITUCION

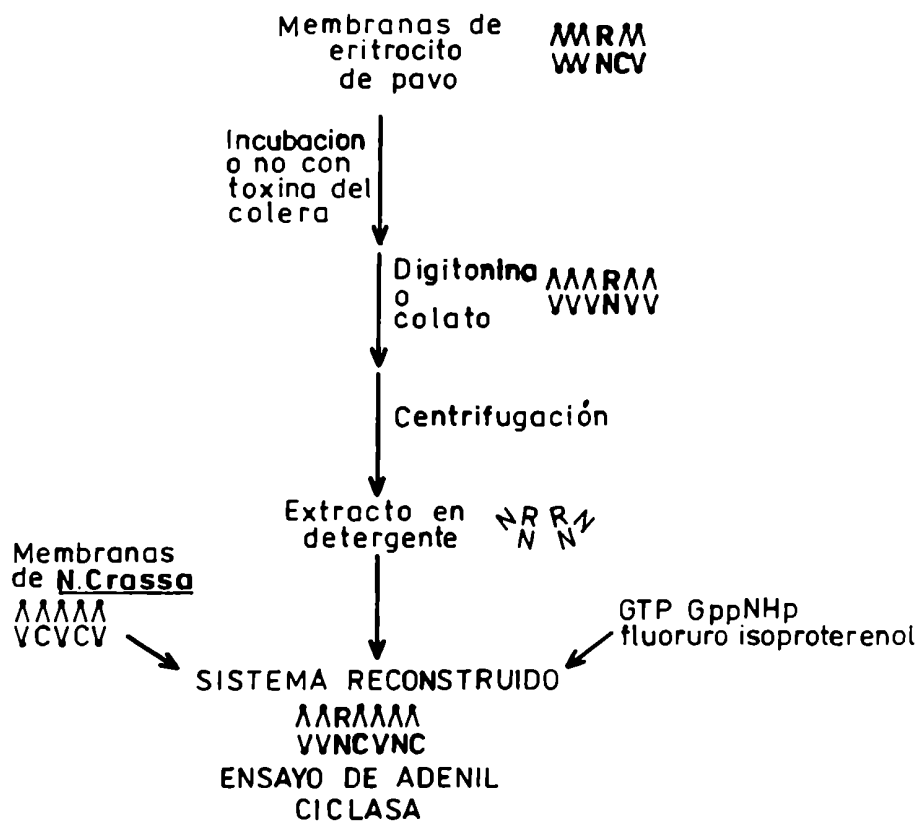


Figura 21. Esquema general de reconstitución del sistema adenil ciclasa dependiente de  $Mg^{2+}$ .  
R: receptor; N: componente regulatorio; C: componente catalítico.

tado II-1 de "Materiales y Métodos" y membranas de hígado de rata pretratadas con N-etilmaleimida.

Ambos tipos de membranas fueron resuspendidas con  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM, en un volumen final de 1 ml, con una concentración de proteínas de 4 mg por ml. Se incubó la suspensión durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , y posteriormente se le adicionó durante 100 segundos 0,5 ml de PEG 6.000 (520 mg/ 0,48 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1 mM). Durante los dos minutos siguientes se agregaron 7 ml del mismo tampón. La suspensión se agitó, se llevó a  $0^\circ\text{C}$  y se la centrifugó a  $105.000 \times g$  por 60 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

Se siguió el mismo procedimiento para fusionar membranas de N. crassa (cepa salvaje) obtenidas según lo especificado en el apartado I-1 de "Materiales y Métodos".

XVII. Obtención de anticuerpos monoclonales para las adenil ciclasas de Neurospora crassa y Trypanosoma cruzi.

XVII-1. Esquema de inmunización.

Se utilizaron para la inmunización ratones hembras Balb/c de cincuenta días de edad. Fueron inyectados en forma subcutánea con 50  $\mu\text{g}$  de proteína emulsionada con adyuvante de Freund completo (1:1). Los inmunógenos fueron una alícuota de la preparación de Bio-Gel de la ciclase de Neurospora (apartado X-2 de "Materiales y Métodos") o una alícuota de la preparación del isoelectroenfoque de la ciclase de T. cruzi (apartado VII-2 de "Materiales y Métodos"). A los siete días se hizo otra inyección, pero ésta fue sin adyuvante. Tres días más tarde, los animales fueron sacrificados.

## ESQUEMA DE FUSION DE MEMBRANAS

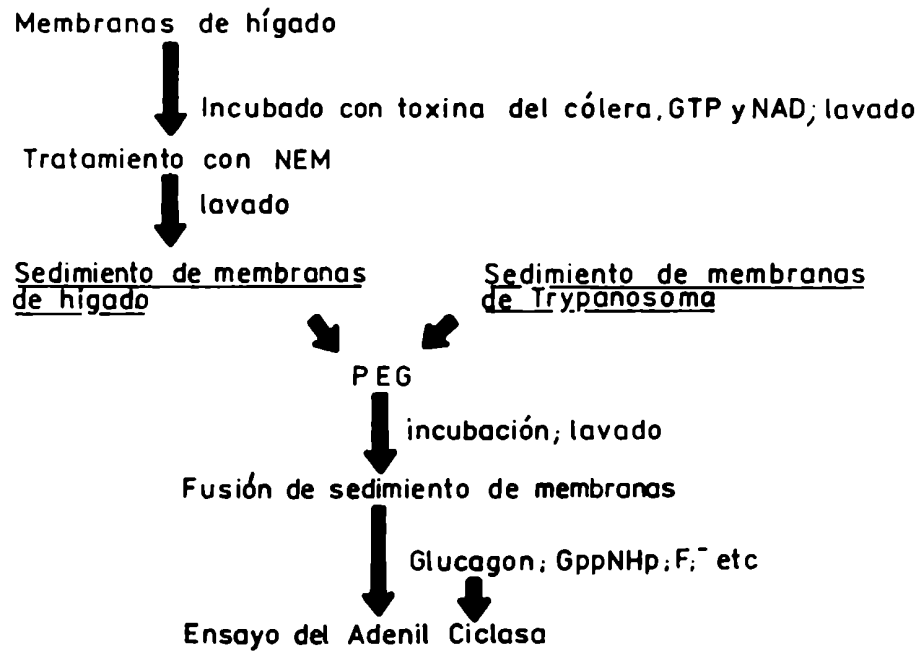


Figura 22. Esquema general de fusión de membranas.

XVII-2. Procedimiento de fusión.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente fueron sumergidos en una solución desinfectante. Se hizo una incisión en el abdomen y se extrajo el bazo, que fue colocado en una caja de Petri con 10 ml de medio A, conteniendo medio Eagle modificado por Dulbecco de Gibco (10,05 mg/ml), bicarbonato de sodio (2 mg/ml), glutamina (0,292 mg/ml), estreptomycin (0,1 mg/ml), penicilina (100 unidades/ml) y anfotericina B (0,002 mg/ml). Posteriormente, se colocó el bazo sobre una grilla metálica y se disgregó el órgano con el émbolo de una jeringa plástica, recogiendo el material sobre una caja de Petri pequeña (P<sub>35</sub>), que contenía 1 ml de medio A. Se lavó la grilla de ambos lados con 2 ml de medio A con mucho cuidado, evitando que caiga sobre la placa el estroma del bazo. A continuación se transfirieron los 3 ml de la suspensión a un tubo de forma cónica de polipropileno que contenía 7 ml de medio A y se dejó decantar la suspensión durante 2 minutos, al cabo del cual se transfirió el sobrenadante a un tubo semejante al usado antes. Se centrifugó a 1.000 rpm en una centrífuga Sorvall de mesa GLC-4 (Dupont) 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Por este procedimiento se obtuvo un rendimiento de  $5-10 \times 10^7$  células por bazo. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de  $\text{ClNH}_4$  0,17 M frío, se agitó bien y el tubo fue sumergido en hielo durante 10 minutos, esta etapa es fundamental porque de este modo se lisan los eritrocitos. Luego se agregó 10 ml de medio B, que fue el medio A suplementado con 20% (V/V) de suero fetal bovino, inactivado a 56°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 1.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio A y se contaron en cámara de Neubauer, controlándose la viabilidad con el uso del colorante Azul de Tripán. Por otro lado, las células de mieloma (63-Ag 8.6.5.3.) fueron

cosechadas, centrifugadas y resuspendidas en 20 ml de medio A. Esta suspensión contiene generalmente  $1-5 \times 10^7$  células. Se mezclaron ambas suspensiones celulares. La relación de células esplénicas a células de mieloma fue del orden de 1:10, pudiendo llegar incluso a 1:1. A continuación se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y a las células se les agregó 0,7 ml de polietilen-glicol (PEG) 1.300 al 50% (P/V); esta operación se realizó con el tubo sumergido en un baño de agua a 37°C, agregando el PEG gota a gota, muy lentamente, durante 90 segundos. A continuación se agregaron 15 ml de medio A durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó a 1.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y las células se resuspendieron en 35 ml de medio C, el cual contiene medio B con 50% (V/V) de medio condicionado (este medio es el proveniente del mantenimiento de las células de mieloma, con las que estuvo en contacto por tres días). Las células se distribuyeron en cajas de Petri, dos cajas grandes con 12 ml de suspensión cada una y dos cajas chicas con 6 ml cada una. También se colocaron en multiplacas de 96 pocillos, en los que se dispusieron 100  $\mu$ l de la suspensión (aproximadamente 50 células). Las células se mantuvieron a 37°C en una estufa en atmósfera de aire y anhídrido carbónico 5%.

A las 24 horas se extrajo el 25% del medio y se adicionó medio D, un volumen equivalente al extraído. Este medio, es medio B pero conteniendo además 13,61  $\mu$ g/ml de hipoxantina, 3,78  $\mu$ g/ml de timidina, 1,76  $\mu$ g/ml de aminopterina y medio C, 50% (V/V). Este procedimiento se repitió durante tres días, de modo tal que al cuarto día las células se encontraron en 100% de medio D (H.A.T.). A partir de ese momento, las células se mantuvieron en medio H.A.T. por un período de un mes, con cambio de medio cada tres días. Posteriormente se cambió de medio, medio E (medio D sin aminopterina y 50% (V/V) medio C). En estas condiciones las células estuvieron quince días.

### XVII-3. Cultivo y Selección.

Luego de hacer el pasaje de células por el medio E, se las mantuvo en medio C, cambiándolo cada tres días.

El clonado de las células híbridas se realizó por dilución límite (221) seleccionando los pocillos que tenían más actividad de anticuerpo. En los mismos se resuspendieron las células con una espátula de goma, se las trasvasó a un tubo que tenía medio C y se las contó. Luego se diluyó (en medio C) hasta una concentración de 50-90 células/10 ml y se colocó 0,1 ml en cada pocillo de una multiplaca de 96 pocillos. Después de 20-30 días, se midió la actividad del anticuerpo y las células del pocillo en el cual había mayor actividad, se traspasaron a pocillos de 2 ml de capacidad, para su expansión.

El esquema general del método de obtención de anticuerpos monoclonales se representa en el figura 15 del apartado VII-2 de la "Introducción".

### XVII-4. Congelamiento de los híbridos.

Se efectuó el congelamiento de los clones en cada paso en que se consideró necesario. Para ello se centrifugaron entre  $0,8-1 \times 10^6$  células/ml y resuspendieron en una solución que contenía 5% (V/V) de dimetil sulfoxido (DMSO) y 95% de suero fetal bovino, a una concentración de  $10^6-10^7$  células/ml. Se colocó 1 ml de la suspensión en tubos plásticos (Nunc) e inmediatamente se los llevó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una vez congelados o luego de dejarlos durante una noche a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se los pasó a un termo que contenía nitrógeno líquido.

Para reconstituir los cultivos, se los descongeló rápidamente y diluyó a 10 ml con medio C a una concentración de  $4 \times 10^5$  células viables/ml y se colocaron 0,1 ml en cada pocillo de una multiplaca.



XVII-5. Determinación de inmunoglobulinas en el medio condicionado por los híbridos.

Para saber si los híbridos mantenidos en cultivo estaban segregando inmunoglobulinas, se procedió a realizar la prueba inmunoenzimática (E.L.I.S.A.) que a continuación se detalla:

En multiplacas de cultivo, que poseen 24 pocillos, se colocó en cada uno de ellos filtros "Millipore" (0,45  $\mu$ m), sobre los que se sembró de 1-5  $\mu$ g de proteína (antígeno) en un volumen no mayor de 5  $\mu$ l en el centro de cada filtro y se dejó secar a 4°C. Posteriormente se lavó cada filtro durante 30 minutos con 1 ml de TRIS-HCl 10 mM pH:7,2, conteniendo NaCl 0,15 M (TBS). El paso siguiente fue hacer un lavado durante 30 minutos con 1 ml de TBS, conteniendo 3% (P/V) de albúmina sérica bovina, fracción V (TBS-BSA), esto se realizó a 37°C con agitación suave, seguidamente se lavaron los filtros con 1 ml de TBS durante 1 minuto y luego se agregó 0,250-1,00 ml de los medios de cultivo en el que se hallaba el anticuerpo que se quería ensayar. Paralelamente se hicieron diferentes controles. Entre ellos: medio de cultivo perteneciente a híbridos que fueron el resultado de una fusión con células esplénicas de ratones no inmunizados; medio proveniente de células de mieloma; antígeno solo y antígeno con el segundo anticuerpo. Una vez que se tuvieron los filtros con los distintos medios, se dejó con agitación suave durante 18 horas a temperatura ambiente. A continuación se hicieron 5 lavados de 1 ml cada uno con TBS en el intervalo de 2 horas. Posteriormente se agregaron sobre cada filtro 0,250-0,50 ml de una dilución 1:300-1:3000 de anti-inmunoglobulina de ratón preparada en conejo y conjugada con peroxidasa (Laboratorios CAPPEL, USA). Así, se mantuvo por 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego se hicieron 5 lavados de 1 ml con TBS en una hora. Posteriormente se lavó con 1 ml de TRIS-HCl pH:7,0 por 10 minu-

tos e inmediatamente se agregaron 0,5 ml de una solución que contenía 0,25 mg/ml de o-dianizidina y 0,025% (V/V) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las placas se mantuvieron en agitación durante 45-90 minutos, dentro de ese lapso se observó varias veces para ver si aparecía o no alguna mancha de color en el lugar en donde se sembró el antígeno; en caso afirmativo esto indicó que los hibridomas a los cuales correspondían los medios ensayados, estaban secretando anticuerpos. En la figura 23 se esquematiza la reacción inmunológica ensayada.

XVII-6. Determinación de anticuerpos específicos para la adenil ciclasa.

La existencia de anticuerpos específicos para la enzima fue determinado de la siguiente manera: para el caso de N. crassa se ensayó con una preparación enzimática (0,8 mg proteína/ml) correspondiente a la purificación de la adenil ciclasa en el paso de filtración en gel de agarosa (apartado X-2 de "Materiales y Métodos") y para T. cruzi se utilizaron membranas correspondientes a P<sub>105</sub>, resuspendidas en CO<sub>3</sub>HNa 1 mM pH:7,4 (8,3 mg proteína/ml). De cada una de estas preparaciones se preincubaron 30 µl con 20 µl de cada uno de los medios correspondientes a los híbridos, a temperatura ambiente durante 180 minutos. Posteriormente, se ensayó la actividad de adenil ciclasa en las mezclas en las condiciones en que se especifica en el apartado IV de "Materiales y Métodos". En este ensayo se hicieron dos controles diferentes, uno fue hecho preincubando las preparaciones con 20 µl de CO<sub>3</sub>HNa 1 mM y el otro con el agregado de 20 µl de un medio condicionado por híbridos que fueron obtenidos con ratones no inmunizados.

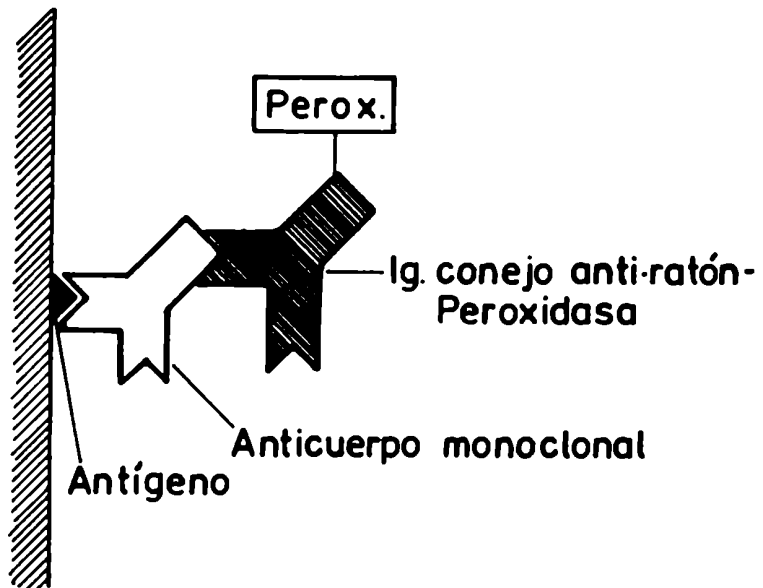


Figura 23. Esquema de la reacción inmunoenzimática (E.L.I.S.A.).

XVII-7. Purificación de los anticuerpos.

XVII-7.1. Precipitación con sulfato de amonio.

Para precipitar las inmunoglobulinas a partir del medio de cultivo, se llevó a una saturación del 50% con sulfato de amonio (S.A), para ello se preparó previamente una solución saturada de  $SO_4(NH_4)_2$ , ajustada a pH:7,0 con  $NH_4(OH)$ . A 50 ml de medio se le adicionó 50 ml de solución saturada de S.A., se sometió a agitación magnética a 0°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 48.000 x g por 45 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en el menor volumen posible (3,5 ml) de agua destilada. Se dializó el material resuspendido contra 200 volúmenes de agua a 4°C. Esta fracción constituyó la denominada preparación de S.A.

XVII-7.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Los 3,5 ml de preparación de S.A. fueron sembrados en una columna de DEAE-celulosa (DE-52, Whatman) de 2 x 8 cm, equilibrada con  $PO_4HNa_2$  10 mM pH:8,0. En estas condiciones las inmunoglobulinas de tipo "G" (los anticuerpos correspondientes a ambas adenil ciclasas son de esta clase) no son retenidas, por lo tanto, las fracciones de interés correspondieron al percolado. Se recogieron 0,5 ml por fracción a una velocidad de 0,1 ml/minuto. El perfil del eluido fue seguido midiendo absorbancia a 280 nm.

XVII-8. Caracterización de los anticuerpos por inmunoelectroforesis.

XVII-8.1. Dispositivo experimental.

Las inmunolectroforesis se realizaron utilizando como soporte portaobjetos de vidrio. Sobre los que se colocó agarosa y posteriormente a la gelificación se prolongaron los extremos con trozos de papel de filtro destinados a asegurar las conexiones eléctricas. Estas placas fueron colocadas sobre los bordes internos de una cuba cromatográfica marca LKB modelo 2117 Multiphor, en cuyos compartimientos se encuentran los electrodos sumergidos en el tampón veronal sódico 50 mM pH:8,6 (223).

XVII-8.2. Preparación de las placas de agarosa y electroforesis.

Se preparó agarosa (de una calidad tal que no presentara electroendósmosis) en una solución al 3% (P/V) en agua destilada y luego se la diluyó al medio con el tampón de corrida. Con una pipeta de 5 ml se colocaron sobre portaobjetos unas gotas de agarosa fundida y con la misma pipeta se extendieron de modo de cubrirlos totalmente. Se dejó solidificar y se colocó en una estufa a 50-80°C hasta sequedad. Posteriormente los portaobjetos se colocaron sobre una superficie perfectamente horizontal y con pipeta de 5 ml se vertieron 4-5 ml de agarosa fundida sobre la película de agarosa base. Se dejó solidificar a temperatura ambiente. Con la ayuda de instrumentos apropiados, se practicó en la parte media del portaobjetos una doble incisión perfectamente centrada de 2 mm de separación y 65 mm de longitud. Luego se practicó en forma equidistantes respecto de la doble incisión y de los extremos y a una distancia de 14 mm entre los centros, dos orificios de 1,8 mm de diámetro. Con una micropipeta se sembraron 5  $\mu$ l de la muestra que contenía el anticuerpo monoclonal que se deseaba analizar en uno de los orificios; en el otro orificio se colocaron 5  $\mu$ l de medio control, el cual contenía azul de bromo-fenol en NaCl 0,15 M,

como indicador.

Los portaobjetos se dispusieron sobre el soporte de la cámara electroforética; se conectó la fuente de poder de manera tal que la intensidad de corriente fue de 8 mA por portaobjeto. Esta se mantuvo hasta que el colorante se desplazaron 30-35 mm.

#### XVII-8.3. Inmunodifusión.

Finalizada la electroforesis, con una aguja de punta biselada se retiró de los portaobjetos la porción de agar limitada por la doble incisión longitudinal. De este modo, queda un surco en el que, con una micropipeta, se colocó el antisuero correspondiente hasta llenarlo. Los portaobjetos luego se dispusieron en una cámara húmeda de base plana y nivelada, se dejó difundir durante 24-48 horas.

#### XVII-8.4. Coloración de las placas.

Las placas fueron lavadas por inmersión de las mismas en NaCl 0,15 M, con dos cambios de la solución durante 24 horas. Posteriormente se colocaron las placas en agua destilada 3 horas o más, con varios cambios. Se secó el gel, recubriendo las placas con un papel de filtro húmedo y se colocaron en una estufa a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se lavó con agua común, se secó ligeramente y luego se sumergió por 15-30 minutos en una solución al 0,5% (P/V) de Amido Swartz en metanol-ácido acético-H<sub>2</sub>O (4,5:1:4,5). Las placas fueron lavadas con la misma solución en que fue disuelto el colorante.

#### XVII-9. Electrotransferencia de adenil ciclasa e inmunoprecipitación "in situ" con anticuerpos específicos.

La adenil ciclasa de T. cruzi proveniente de un ex-

tracto crudo y del eluido de una columna de hexilamino-sefarosa fue sometida a una electroforesis en condiciones disociantes, como se especifica en el apartado XI de "Materiales y Métodos". Las proteínas fueron luego transferidas a papel de nitrocelulosa. El procedimiento se esquematiza en la figura 24. Se utilizaron hojas de papel de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro, marca Millipore, las cuales se humedecieron con agua destilada. Sobre el gel se colocó el papel húmedo y a ambos lados se colocaron papeles de filtro (Whatman 3 MM) embebidos en agua, esto se dispuso entre dos paños absorbentes tipo "Scotch Brite", lo cual fue soportado por dos placas de acrílico con múltiples perforaciones, este dispositivo fue asegurado por bandas elásticas y colocado en la cuba de transferencia. El tampón utilizado fue TRIS-HCl 192 mM-glicina con metanol 20% (V/V) a pH: 8,3. La intensidad aplicada fue de 3 A durante 3 horas (222).

El papel de nitrocelulosa proveniente de la transferencia se lo trató por 1 hora con TBS-BSA a 37°C, esta etapa se realizó para saturar los sitios de unión inespecíficos. Luego se lavó con TBS varias veces y finalmente se incubó con el anticuerpo específico diluido en TBS-BSA conteniendo 10% (V/V) de suero normal de ratón durante 14-16 horas a temperatura ambiente con agitación suave. El papel fue lavado con TBS, 5 cambios en una hora e incubado con el segundo anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina del primer antisuero, es decir inmunoglobulina de conejo anti-Ig de ratón, el cual tiene peroxidasa acoplada. Este fue utilizado en una dilución 1/300 en TBS. La incubación se hizo a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se lavó con TBS, 5 cambios en una hora. Para la reacción de color (222), el papel se embebió en una solución que contenía 25  $\mu$ g de o-dianizidina/ml, 0,01% (V/V)  $H_2O_2$  y TRIS-HCl 10 mM pH:7,4. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usar a partir de una solución que contenía 1% de o-dianizidina en metanol y 0,30% (V/V)  $H_2O_2$ . La reacción fue finalizada después de los 30 minutos por lavado

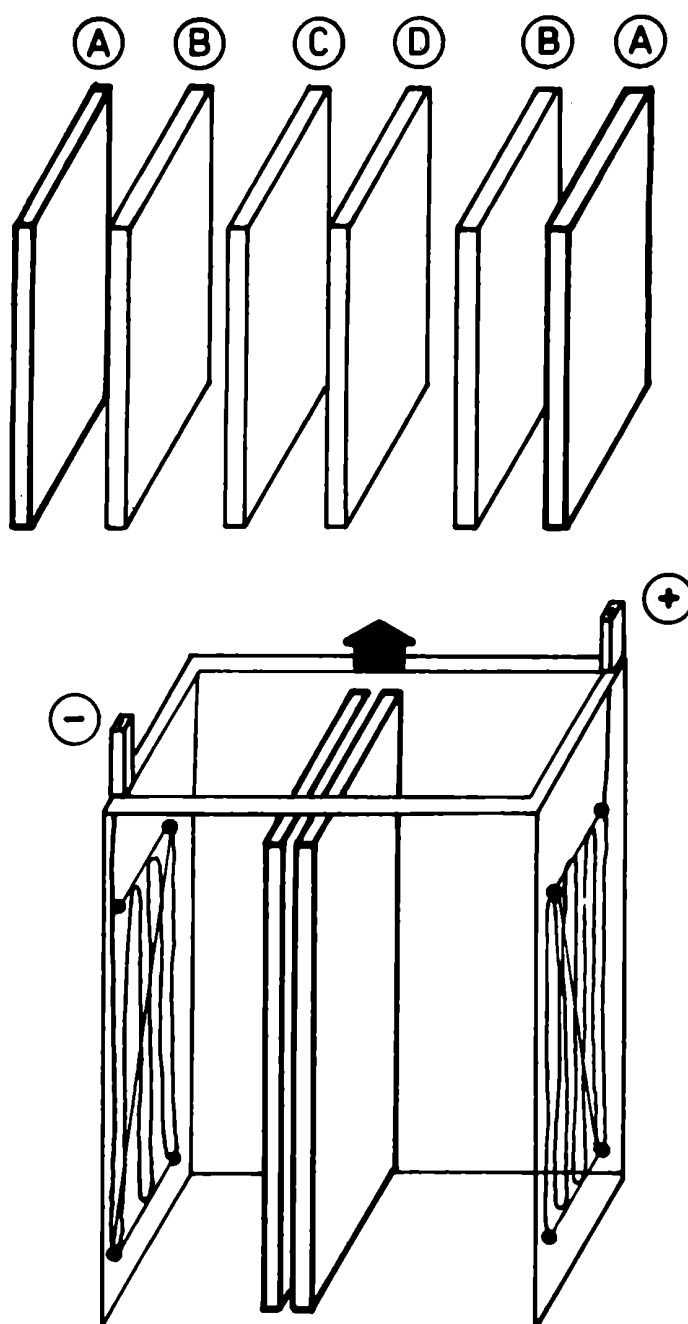


Figura 24. Esquema de la cuba electroforética empleada para la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa.  
A: "Scotch Brite"; B: papel Whatman 3 MM; C: gel; D: papel de nitrocelulosa.



con agua. El papel de nitrocelulosa fue secado entre papeles de filtro y se conservó protegido de la luz.

XVIII. Preparación de anticuerpo-sefarosa.

Para la preparación de esta matriz cromatográfica se siguió el método descrito por Cuatrecasas (207), que se detalló en el apartado V de "Materiales y Métodos".

XIX. Purificación por inmuno-afinidad de la adenil ciclasa de T. cruzi.

La preparación de hexilamino-sefarosa, se concentró por filtración a través de los minifiltros verticales de Amicon, hasta un volumen de 2,5 ml (0,89 mg de proteína/ml), y se sembró en una columna de anticuerpo-sefarosa (0,75 x 7 cm), equilibrada con tampón A. El percolado se recicló 6 veces. La columna fue lavada con 50 ml de tampón de equilibrio, conteniendo NaCl 0,5 M y Lubrol PX 0,5%. La elución se realizó con Trietilamina 50 mM pH:11,8. Se recogieron fracciones de 0,5 ml, cada una de ellas en una cantidad suficiente de MOPS 1 M pH:7,1, para neutralizar rápidamente el eluido (aproximadamente 100  $\mu$ l). A cada una de las fracciones se le midió la actividad de adenil ciclasa, y aquellas que fueron positivas, se las sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes.

XX. Otras determinaciones realizadas.

- Proteínas: se realizó por el método de Lowry et al (224), utilizando como patrón albúmina sérica bovina recristalizada.

R E S U L T A D O S   Y   D I S C U S I O N

## RESULTADOS Y DISCUSION

### I. Adenil ciclasa de Trypanosoma cruzi.

#### I-1. Localización celular.

Se inició el estudio de la localización de la adenil ciclasa de T. cruzi, analizando su distribución en las diferentes fracciones obtenidas a partir de un homogeneizado de epimastigotes, preparado como se especificó en el apartado II-2 de "Materiales y Métodos".

En la tabla V se resumen los valores de las actividades específicas y totales cuando se sometió a centrifugaciones diferenciales dicho extracto. Como puede observarse casi el 100% de la actividad enzimática se encuentra asociada a la fracción sedimentable y solo un 2% en la fracción soluble.

Estos resultados confirman datos de otros autores (189) en el sentido de que la mayor parte de la actividad de adenil ciclasa en T. cruzi está localizada en las fracciones particuladas, correspondiendo estas a membrana plasmática.

La localización de la adenil ciclasa en fracciones membranosas, es una característica general de la enzima de organismos eucariotes. La única excepción descrita es la adenil ciclasa de túbulos seminíferos, tejido en el cual se la encuentra soluble (9) (18). En eucariotes inferiores tales como B. emersonii (168) y D. discoideum (224) que carecen de pared celular, y en N. crassa (8), S. cerevisiae (14) y M. rouxii (162), que poseen pared celular, se encontró que la adenil ciclasa se localizaba en fracciones particuladas.

Para poder estudiar y caracterizar la adenil ciclasa fue necesario buscar un método para aislar la enzima, o parte de ella, en forma soluble. Para ello se incluyeron en los tampones

seleccionados para la extracción, diferentes agentes que interactúan con los componentes de la membrana, disminuyendo así, la estabilidad de los complejos lípido-proteína.

#### I-1.1. Tratamiento con detergentes.

Makino y colaboradores (225) clasifican la interacción de detergentes con proteínas según dos categorías. La primera implica la interacción a través de la unión inespecífica del detergente a sitios de baja afinidad en la proteína. Esta unión es cooperativa y va acompañada con un cambio conformacional importante de la proteína. En estas circunstancias es usual que la actividad enzimática de la proteína se pierda. Un ejemplo típico es el caso del dodecil sulfato de sodio (SDS). En la segunda categoría, se ubican los detergentes que interactúan a nivel de los sitios hidrofóbicos de alta afinidad, sobre la superficie de la proteína. La interacción probablemente no es cooperativa y no se acompaña de cambio conformacional. Por consiguiente, la actividad de la enzima se mantiene. A esta clase de detergentes pertenece el colato, el deoxicolato y los detergentes no iónicos del tipo del Tritón X-100, Lubrol PX, Brij 58, etc. Además de la capacidad que poseen estos detergentes para solubilizar enzimas de membrana en forma activa, no interfieren en el uso de resinas de intercambio iónico y métodos electroforéticos desarrollados para proteínas solubles en agua.

Los detergentes antes mencionados se han utilizado con éxito en la solubilización de adenil ciclasa (226) (227).

Para emplear en I. cruzi estos métodos de extracción con detergentes, se utilizó como fuente de enzima sedimentos de membranas ( $P_{105}$ ), los que fueron resuspendidos en tampón B, conteniendo los diferentes detergentes a concentraciones del 0,5 al 1% (P/V). La homogeneización se hizo en un homogeneizador tipo Potter y se dejó durante 60 minutos bajo agitación magné-

tica a 4°C.

En la tabla VI se muestran las actividades de adenil ciclasa, expresadas en por ciento respecto de la actividad inicial, tanto en sedimento como en sobrenadante luego de una centrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos. Los resultados indican claramente que los agentes solubilizantes utilizados no son efectivos para tal motivo y que además, disminuyen notablemente la actividad enzimática.

Detergente utilizado	Actividad recuperada luego de centrifugar el extracto a 105.000 x g por 60 minutos (%)	
	Sedimento	Sobrenadante
-	98,5	1,5
Lubrol PX (1%)	54	3,72
(0,5%)	57	8,10
Triton X.100 (1%)	52,5	2,72
(0,5%)	60	4,88
Brij-58 (1%)	26,74	10,90
Colato de sodio (1%)	2,20	0,21
Deoxicolato de sodio (1%)	11,23	0,84
Digitonina (1%)	93	4,42

Tabla VI. Distribución de la adenil ciclasa en extractos preparados en presencia o ausencia de detergentes.

Se ve así que la mayor parte de la actividad de la adenil ciclasa es resistente a la solubilización. La reextracción del sedimento de 105.000 x g con tampón B, conteniendo los diferentes agentes no aumentó la solubilización en forma

apreciable y si la inactivación.

Estos datos llevarían a pensar que la enzima de T. cruzi, al igual que las demás ciclasas estudiadas, es una protefna que tiene un fuerte interacción con la membrana, ya que es resistente a los tratamientos antes vistos.

#### I-1.2. Tratamiento con enzimas lipolíticas.

La solubilización de protefnas de membranas, en algunos casos se ve favorecida por el uso de enzimas lipolíticas (228). Para analizar este punto las membranas fueron resuspendidas en tampón B y tratadas con fosforilasa A y fosforilasa C y también con lipasa pancreática. Con cada una de las enzimas se hicieron incubaciones separadas y combinadas. En ninguno de los casos se logró una solubilización apreciable, sin embargo decreció mucho la actividad enzimática.

#### I-1.3. Tratamientos mecánicos.

Se han descrito diversos tratamientos mecánicos que favorecen la solubilización de protefnas de membranas. Estos tratamientos provocan rupturas de la bicapa y de esta manera favorece el mayor contacto de las zonas intrínsecas de la misma con diferentes agentes solubilizadores. Así por ejemplo, sonicado, congelamiento y descongelamiento, abrasión, etc (229).

Para solubilizar la adenil ciclasa de T. cruzi, se suspendieron las membranas en tampón B, conteniendo los diferentes detergentes utilizados anteriormente y se las sonicó en un equipo Branson Sonic modelo W140, con cuatro pulsos de 15 segundos a máxima intensidad. El homogenato se centrifugó a 105.000 x g por 60 minutos y se midió actividad en sedimento y en sobrenadante. Este procedimiento, dió lugar a una inactivación casi total de la enzima, sin mayor solubilización de la misma.

Se ensayó además la técnica del congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento y posterior homogeneización en un potter. Tampoco se tuvieron resultados efectivos, además de observarse una pérdida muy marcada de la actividad, comparando siempre con un control no tratado.

#### I-1.4. Tratamiento con sales.

Las membranas al ser expuestas a alta fuerza iónica alteran su estructura y se disocian los complejos proteína-proteína y proteína-lípido, que son mantenidos por interacciones de tipo electrostático (230).

Se probó el efecto de varias sales sobre las membranas de I. cruzi. Para ello se procedió de la siguiente manera: el sedimento de 105.000 x g se resuspendió en tampón B al que se le adicionaron las diferentes sales en las concentraciones que se especifican en la tabla VII. La suspensión se homogeneizó en un potter y se dejó agitando magnéticamente durante 60 minutos a 0°C, al cabo de ese tiempo se centrifugó a 105.000 x g por 60 minutos y se midió la actividad enzimática en el sedimento y en el sobrenadante obtenidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  solubiliza un 20% de la enzima sin inactivarla. Esto es muy importante, ya que hasta el momento no se había logrado ninguna solubilización apreciable. Por ello se decidió probar tratamientos combinados de sales y detergentes, como se detalla a continuación.

Sal utilizada	Actividad recuperada luego de la extracción de las membranas con o sin sales y centrifugación posterior a 105.000 x g (%).	
	Sedimento	Sobrenadante
-	99,5	0,5
ClNa (0,5 M)	96,7	0,75
ClK (0,5 M)	95	1,3
SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> (0,5 M)	86	7,2
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (0,5 M)	72,3	20,9
SCNK (0,1 M)	99	1

Tabla VII. Distribución de la actividad de adenil ciclasa luego de la extracción con diferentes sales en presencia del tampón B.

I-1.5. Tratamiento con detergentes y sales.

Se pensó que la presencia simultánea de detergente y SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> podría potenciar el efecto de cada uno y obtener así, un mayor grado de solubilización. Así entonces, se trató a las membranas con tampón B, conteniendo Lubrol-PX y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en concentraciones variables. Se sometió al homogeneizado a agitación magnética suave durante 120 minutos a 0°C. Posteriormente se centrifugó a 105.000 x g durante 60 minutos y se midió en ambas fracciones la actividad enzimática. Los resultados pueden observarse en la tabla VIII.

Con los resultados obtenidos se puede observar que la acción combinada del detergente y la sal es el método más efectivo de solubilización de la enzima de T. cruzi. Para la purificación y caracterización se utilizó el S<sub>105</sub> obtenido pos-



teriormente a la extracción con Lubrol PX-0,1% en presencia de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  0,5 M y centrifugación.

Agente Extractante	Actividad recuperada luego de la extracción y centrifugación de las membranas (%).	
	Sedimento	Sobrenadante
-	99,8	0,2
Lubrol PX (0,1%) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0.1 M)	36,55	32,75
Lubrol PX (0,1%) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0.5 M)	40,35	45,88
Lubrol PX (0,5%) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0.1 M)	33,60	28,12
Lubrol PX (0,5%) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0.5 M)	30,14	20,17

Tabla VIII. Distribución de la actividad de la adenil ciclasa posteriormente a la extracción combinada de detergente no iónico y sal.

## II. Purificación parcial de la adenil ciclasa de T. cruzi.

### II-1. Cromatografía en hexilamino-sefarosa.

El primer paso de purificación consistió en cromatografiar el sobrenadante de 105.000 x g ( $S_{105}$ ) dializado proveniente de la solubilización de la enzima en una columna de hexilamino-sefarosa. La figura 25 muestra el perfil de elución de la columna. La actividad enzimática eluyó en un solo pico a una

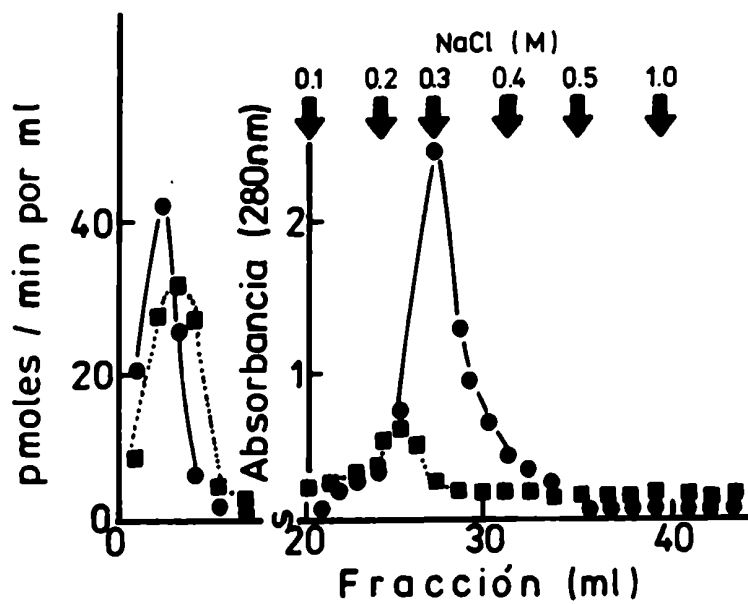


Figura 25. Cromatografía en columna de hexilamino-sefarosa de un extracto solubilizado (S<sub>105</sub>) de T. cruzi.

●, actividad de adenil ciclasa; ■, proteína.

concentración de ClNa de 0,30M, con una actividad específica de 280 pmoles/min/mg de protefna. Este valor es aproximadamente 4 veces mayor que el que corresponde al S<sub>105</sub>.

Los detalles experimentales de este procedimiento fueron descriptos en la sección de "Materiales y Métodos".

#### II-2. Enfoque isoeléctrico en gradiente de sacarosa.

Con el fin de determinar el punto isoeléctrico de la adenil ciclasa, una alfcuota de una preparación del hexilamino-sefarosa fue sometida a un enfoque isoeléctrico en gradiente de sacarosa, armado en columna, con un rango de pH de 3,5 a 10 unidades. En la figura 26 se muestra el resultado de dicho experimento. La actividad enzimática enfocó en un solo pico a pH:6,2, completamente resuelto del resto de las protefnas localizadas en la zona ácida del gradiente. La actividad recuperada del electroenfoque fue muy escasa (aproximadamente un 9% de la actividad sembrada), esto impidió seguir su purificación .

#### II-3. Discusión.

El principal inconveniente que surge en la purificación de la adenil ciclasa de T. cruzi, es la inactivación gradual de la enzima luego de su solubilización.

La recuperación de la actividad enzimática, después del enfoque isoeléctrico, no permitió que se usara esta preparación para la caracterización molecular de la ciclasa.

Muchas protefnas interactúan con colorantes de triazina unidos a sefarosa por un mecanismo de absorción, específico o no, aún no conocido (231). Se ha propuesto que el azul de Cibacrón y otros sulfonatos policromáticos podrían imitar cier-

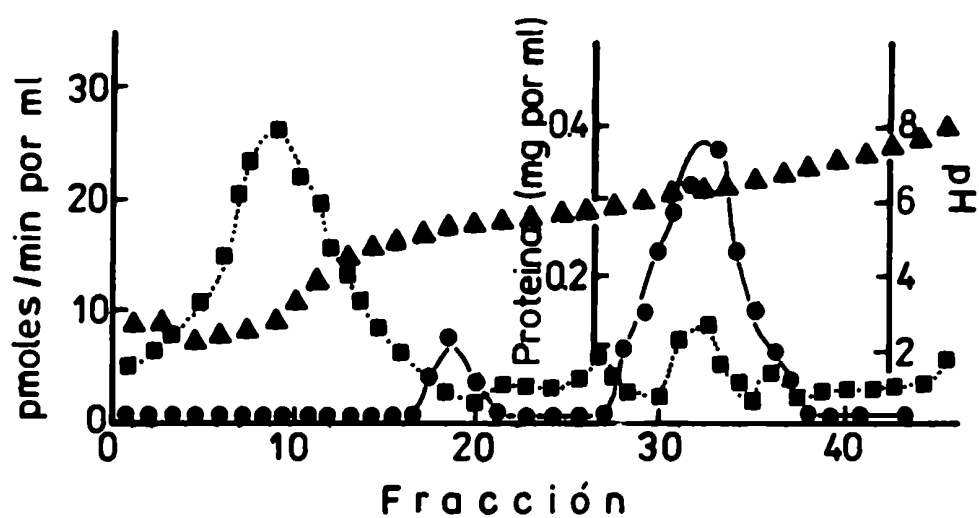


Figura 26. Enfoque isoelectrico de una preparación de Hexilamino-sefariosa. Rango de pH: 3,5 a 9,0 ( $\blacktriangle$ ), pH; ( $\bullet$ ), actividad de adenil ciclasa; ( $\blacksquare$ ), protefna.

tos aspectos de la adsorción de nucleótidos a los "sitios nucleótidos" de las proteínas (232).

Empleando estos métodos no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por ello es que se utilizó para purificar la enzima hexilamino-sefarosa, la cual tiene características hidrofóbicas, que es adecuada para el caso de aquellas proteínas que tengan asociados detergentes.

### III. Caracterización molecular de la adenil ciclasa de T. cruzi.

#### III-1. Filtración en gel (Bio-Gel A 5m)

La figura 27 muestra el perfil de elución de una preparación de hexilamino-sefarosa, cromatografiada en una columna analítica de Bio-Gel A-5m. La actividad de adenil ciclasa eluyó como un único pico que precedió al de la fumarasa, con una constante  $K_{e1} = 1,8$ , correspondiente a un radio de Stokes de 5,65  $\mu$ m. Las flechas indican la posición de los picos de elución de las proteínas marcadoras.

#### III-2. Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa

Para conocer el coeficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$  y  $S_{20,D}$ ) y el volumen específico ( $\bar{v}$ ) parcial de la enzima, se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa preparados con  $H_2O$  y  $D_2O$ . En la figura 28 se observan los resultados. En el gráfico se encuentra además la curva de calibración realizada, según la distancia recorrida por cada proteína marcadora desde el borde superior de cada gradiente hasta la posición alcanzada ( $r$ ) al finalizar la centrifugación, en función del coeficiente de sedimentación ( $s$ ). Las constantes de sedimentación

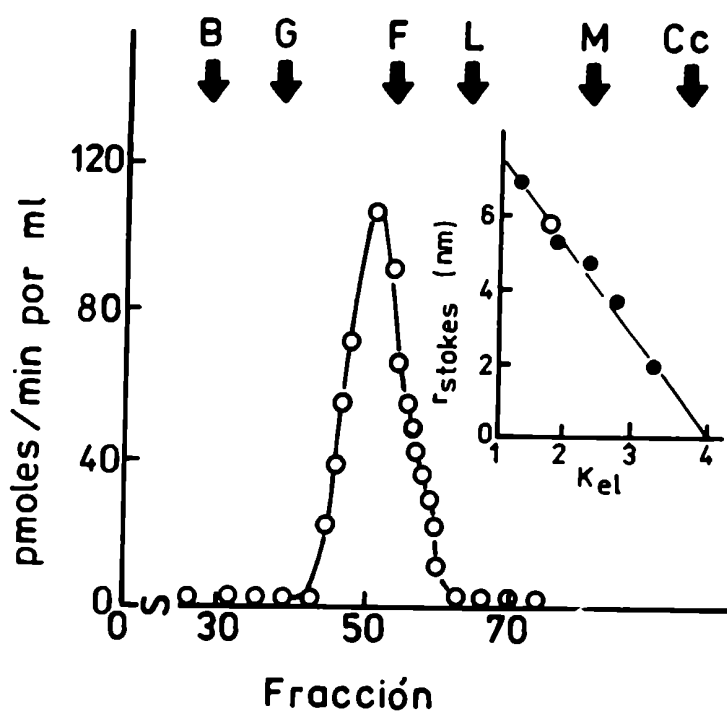


Figura 27. Filtración en columna analítica de Bio-Gel A-5m de una preparación de hexilamino-sefarosa. El gráfico inserto muestra la relación entre la  $K_{el}$  y los radios de Stokes para las proteínas marcadoras ( $\bullet$ ) y para la ciclase ( $\circ$ ). B, bacterias; G,  $\beta$ -galactosidasa; F, fumarasa; L, lactato deshidrogenasa; M, malato deshidrogenasa y C<sub>c</sub>, citocromo c.

para la adenil ciclasa fueron diferentes en ambos gradientes, presentando un valor para  $H_2O$  de 6,25 y para  $D_2O$  de 5,05. Esto está indicando que la enzima tiene moléculas de detergente asociada, lo que implica un cambio en el valor del volumen específico parcial de las proteínas marcadoras. Este valor fue calculado, como se especificó en "Materiales y Métodos" y resultó ser igual a 0,83 ml/g.

Conociendo los valores del radio de Stokes, el volumen específico parcial y el coeficiente de sedimentación en  $H_2O$  de la enzima, es posible estimar el peso molecular relativo del complejo proteína-detergente. El valor hallado fue de 230.000 D. Sabiendo que el volumen parcial específico del detergente utilizado (Lubrol PX) es de 0,958 ml/g, se pudo calcular la cantidad de detergente unido a la enzima, que fue de 0,754 mg por mg de proteína.

Además se calculó un coeficiente friccional ( $f/f_0$ ) de 1,33, basándose en las formulas expuestas en el apartado IX-4 de "Materiales y Métodos".

En la tabla IX se resumen los parámetros hidrodinámicos del complejo adenil ciclasa-detergente y el peso molecular calculado para la enzima sola.

### III-3. Discusión.

Cabe destacar que los valores hallados para los parámetros moleculares de la adenil ciclasa de T. cruzi solubilizada con Lubrol PX, fueron determinados en presencia del detergente, por lo tanto los datos obtenidos corresponden al complejo enzima-detergente. Considerando la cantidad de detergente asociado a la molécula se obtuvo un peso molecular bastante inferior, 131.0000.

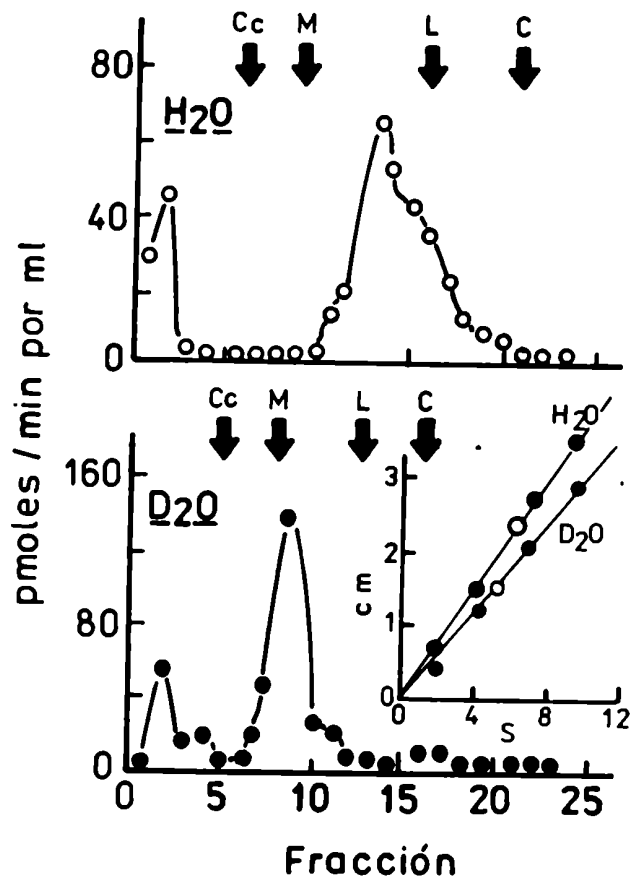


Figura 28. Centrifugaciones en gradientes de sacarosa de una preparación de hexilamino-sefarosa de T. cruzi. Los gradientes se realizaron en H<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O. El gráfico insertado muestra la movilidad en función de los coeficientes de sedimentación de la ciclasa (o) y las proteínas marcadoras (●). c, catalasa; L, lactato deshidrogenasa; M, malato deshidrogenasa y Cc, citocromo c.



I- Complejo protefna-detergente

<u>Parámetro</u>	<u>Valor</u>
$S_{20,w}$ (S)	6,2 $\pm$ 0,15
$S_{20,D}$ (S)	5,0 $\pm$ 0,10
$r_{\text{stokes}}$ (nm)	5,65 $\pm$ 0,10
$\bar{v}$ (ml/g)	0,83
P.M	230.000
f/fo	1,33
pI	6,2
Lubrol:Protefna (mg:mg)	0,87:1,0

## II- Protefna

P.M.	131.000
------	---------

Tabla IX. Parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenil ciclasa de T. cruzi.

En la tabla X se exponen los parámetros moleculares e hidrodinámicos calculados para adenil ciclasas solubilizadas de diferentes organismos y tejidos. Se observa que las enzimas mencionadas poseen pesos moleculares que oscilan alrededor de 200.000D, mientras que el de T. cruzi es menor.

Kornblihtt (9) estudió la adenil ciclasa soluble de testículo de rata y determinó un peso molecular de 70.000D. Esta enzima es  $Mn^{2+}$  dependiente. Podría ser, que esta fuera parte o al menos tuviera un polipéptido común a las ciclasas extraídas

TEJIDO	TESTICULO SOLUBLE	TESTICULO MEMBRANA	NEUROSPORA	RIRON	CEREBRO	HIGADO	LINFOMA S <sub>49</sub>	LINFOMA S <sub>49</sub> CYC	TRYPANOSOMA
Referencia	Kornblihtt (9)	Neer (43)	Reig Macia (174)	Neer (226)	Neer (234)	Stengel (235)	Gilman (127)	Gilman (127)	Esta Tesis
Peso molecular	74.000	190.000	200.000	159.000	220.000	180.000	250.000	190.000	131.000 (230.000)
S <sub>20,w</sub> (S)	4.3	6.7	6.2	5.9	8.1	6.8	8.3	6.5	6.2
Radio de Stokes (nm)	3.9	6.8	7.3	6.2	7.0	7.0	7.1	7.1	5.65
$\bar{v}$ (ml/g)	0.74	0.73	0.74	0.74	0.79	0.82	0.78	0.76	0.83
f/fo	1.4	1.6	1.65	1.6	1.5	1.5	1.6	1.8	1.33

Tabla X. Propiedades hidrodinámicas de las adenil ciclasas soluble y de membrana de distintos tipos de células eucarióticas.

de membrana. Respecto de esto último, cabe señalar que Gilman no obtuvo resultados favorables respecto a una interacción productiva de la ciclase soluble de testículo con una proteína reguladora N (127). Alternativamente podría ser que la molécula de la subunidad catalítica (C) de la ciclase de membranas (200.000D) tuviera más de un polipéptido y que uno de ellos fuera el responsable de la catálisis con  $Mn^{2+}$  y tuviera un peso molecular de 70.000D.

#### IV. Purificación parcial de la adenil ciclase de N. crassa.

##### IV-1. Solubilización.

Se partió de la cepa salvaje St L 74 de N. crassa, utilizando como medio de homogeneización tampón A, conteniendo NaCl 0,5 M, se centrifugó a 105.000 x g, siendo al frente de enzima la fracción soluble (236) como se especificó en el apartado X de "Materiales y Métodos".

##### IV-2. Cromatografía en hexilamino-sefarosa.

El primer paso de la purificación de esta enzima fue cromatografiar el sobrenadante de 105.000 x g ( $S_{105}$ ) dializado exhaustivamente en una columna de hexilamino-sefarosa. En la figura 29 se muestra el perfil de elución de la columna. La enzima eluyó en un pico neto, a una concentración de ClNa de 0,5 M con una actividad específica de 115 pmoles/min/mg de proteína.

##### IV-3. Filtración en gel (Bio-Gel A-5m)

La adenil ciclase eluída de la hexilamino-sefarosa,

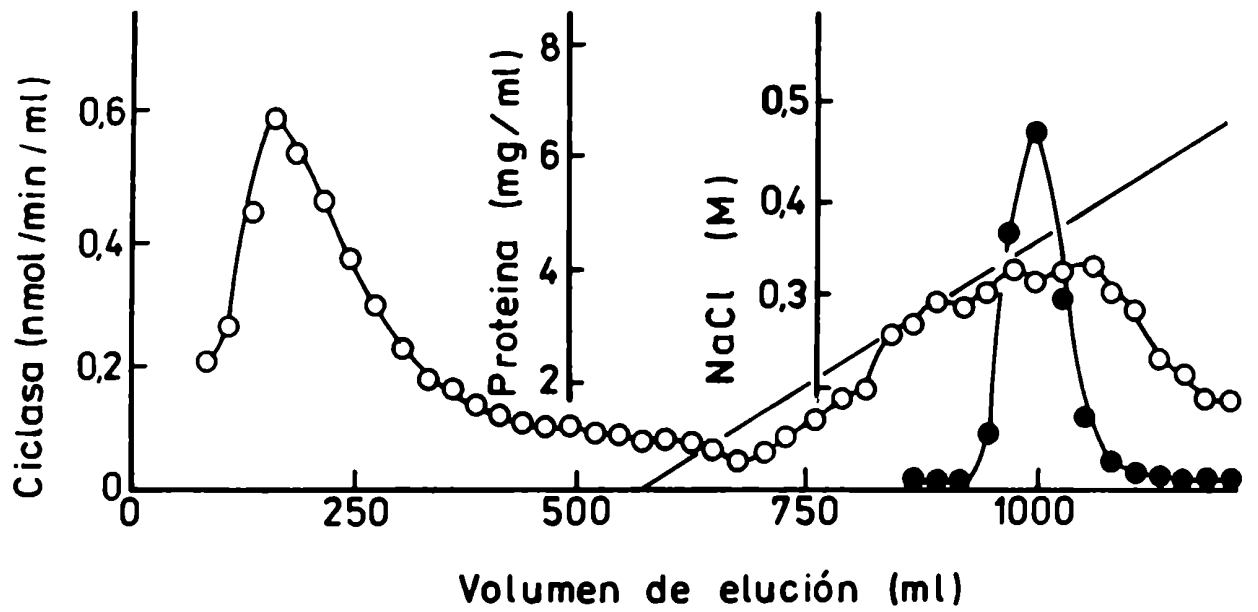


Figura 29. Cromatografía en columna de hexilamino-sefarosa de un  $S_{105}$  de N. crassa.

●, actividad de adenil ciclasa; ○, protefna.

se dializó y concentró por ultrafiltración en membranas de Amicón PM30. Este procedimiento permitió obtener un volumen de 5 ml, el cual se sembró en una columna de Bio-Gel A-5m. La figura 30 muestra el perfil de elución de la columna. La actividad enzimática eluyó en un pico único

#### IV-4. Discusión.

La adenil ciclasa de N. crassa fue purificada a homogeneidad por Reig Macfa (174). El protocolo seguido en esta tesis para su purificación parcial, fue similar. El motivo por el cual se deseó aislar nuevamente esta enzima, fue para utilizarla como antígeno en la obtención de anticuerpos monoclonales.

Para este tipo de técnica no se requiere un inmunógeno de alta pureza, es por ello que para la preparación de tal antígeno se utilizaron solo dos pasos cromatográficos de purificación.

#### V. Experimentos de reconstitución del sistema adenil ciclasa sensible a hormona con la enzima de N.crassa y el componente regulatorio de eritrocito de pavo.

Como se especificó en el apartado II-2 de "Introducción", se supone que el sistema de la adenil ciclasa sensible a hormona está constituido por al menos dos entidades proteicas, el componente regulatorio (N) y el componente catalítico (C) y además el receptor (R) (figura 4).

Estudios hechos por Gilman (127) en diferentes mutantes de linfoma S<sub>49</sub>, llevaron a dilucidar importantes funciones de cada uno de estos componentes. En ausencia de la subunidad

regulatoria, como ocurre en la variante  $cyc^-$  de linfoma  $S_{49}$ , el componente catalítico sólo manifiesta su actividad en presencia de  $Mn^{2+}$  y carece de sensibilidad frente al  $F^-$ , guanil nucleótidos y toxina del cólera. Estas propiedades moleculares le confieren similitud con las adenil ciclasas de Neurospora crassa y Trypanosoma cruzi.

En 1978, Ross y Gilman (40) obtuvieron a partir de membranas de la variante  $cyc^-$  del linfoma  $S_{49}$ , un sistema sensible a  $F^-$ , guanil nucleótidos y toxina del cólera, al adicionarles el componente N de membranas de células de linfoma  $S_{49}$ . Resultados parecidos obtuvo Stengel (237), en este caso se reconstituyó el sistema con la adenil ciclasa de espermatozoide y el componente regulatorio proveniente de eritrocito humano, siendo la actividad resultante sensible a los efectores antes mencionados. Además fue sensible a prostaglandinas, esto está indicando que también se transfieren receptores del eritrocito.

En este apartado, se demuestra la existencia de similitudes entre el componente catalítico de la adenil ciclasa de organismos eucariotes inferiores y superiores. Además, se demuestra que la ciclasa de Neurospora puede interactuar con el componente regulatorio proveniente de extractos de membrana de eritrocito. Los detalles experimentales fueron especificados en el apartado XV de "Materiales y Métodos". El esquema seguido para este procedimiento se desarrolló en la figura 21.

#### V-1. Actividad de adenil ciclasa en preparaciones de N.crassa y Eritrocito.

En la tabla XI se puede observar las actividades enzimáticas de las membranas de eritrocito y su correspondiente extracto en digitonina y también de las membranas de N.crassa.

Ligando (M)	Actividad de adenil ciclasa				
	Eritrocito			Neurospora	
	Membranas		Extracto en detergente	Membranas	
	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> o Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
	pmol/min/mg. proteína				
Ninguno	21.1	6.3	0.2	85.7	1.4
Isoproterenol					
10 <sup>-7</sup>	27.2	11.4	0.2	91.1	1.3
10 <sup>-6</sup>	26.3	22.2	0.2	92.1	1.3
10 <sup>-5</sup>	26.9	25.7	0.2	92.5	1.2
Gpp(NH)p, 10 <sup>-6</sup>	29.9	9.4	0.2	90.7	1.3
Isoproterenol, 10 <sup>-6</sup> Gpp(NH)p, 10 <sup>-6</sup>	30.0	31.1	0.2	92.9	1.2
Fluoruro 10 <sup>-2</sup>	332,0	552,0	0.2	92.9	1.3

Tabla XI. Actividades de adenil ciclasa, medidas en presencia de Mn<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, en membranas de *N. crassa*, en membranas de eritrocito de pavo y en extractos en detergente (digitonina) de las membranas de eritrocito. Las mezclas de reacción contuvieron 86, 125 y 75 µg de proteína, respectivamente.

Las membranas de eritrocito, medidas en presencia de  $Mg^{2+}$ , presentaron considerable respuesta al isoproterenol, Gpp(NH)p y Fluoruro. Por el contrario, el efecto del isoproterenol fue menos marcado en presencia de  $Mn^{2+}$ .

En los extractos en digitonina no se pudo detectar actividad enzimática. Lo mismo ocurrió, cuando se preincubó un extracto en colato a 37°C durante 20 minutos (datos no presentados). El pretratamiento de los extractos con toxina del cólera no incrementó la actividad enzimática.

Por otro lado, las membranas de Neurospora tuvieron una actividad dependiente del  $Mg^{2+}$  de aproximadamente el 1% de la obtenida con  $Mn^{2+}$ .

#### V-2. Requerimientos para la obtención de un sistema reconstituido.

En la tabla XII se muestran las actividades de adenil ciclasa medidas en presencia de  $Mg^{2+}$ . Se observó que sólo en las mezclas de incubación en los que había membranas de N.crassa, cepa salvaje y extractos en detergente de eritrocito hubo actividad y además ésta era estimulada por los distintos efectores. Este comportamiento no se manifestó cuando se emplearon preparaciones solubles de ciclasa de N.crassa ni de testículo. Tampoco existió reconstitución cuando se utilizaron membranas de N.crassa de la mutante cr-1 o membranas de N.crassa, cepa salvaje, previamente calentada a 100°C durante 5 minutos.

Esto sugiere que la reconstitución requiere del entorno lipídico de la membrana para que sea efectiva.

El experimento realizado con la mutante descarta la posibilidad de aparición de actividad de adenil ciclasa dependiente de  $Mg^{2+}$ , debido a una reactivación del componente catalítico (C) del eritrocito al interactuar con un soporte membranoso (238).

Un punto muy importante que se debe aclarar, es el



SISTEMA BIOLÓGICO	ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA (pmol/min/mg de protefna)			COMPONENTES EN LA MEZCLA			
	BASAL	ISOPROTERENOL + Gpp(NH)p	FLUORURO	C	R	N	MEMBRANA
Membranas N.Crassa Cepa StL74	1,9	1,6	1,5	+	-	-	+
Membranas N.Crassa Cr-1	0,5	0,4	0,4	-	-	-	+
Membranas N.Crassa Cepa StL74, calentadas	0,3	0,3	0,3	-	-	-	?
Adenil Ciclasa Soluble N.Crassa	1,8	1,4	1,4	+	-	-	-
Adenil Ciclasa Soluble Testículo	0,3	0,5	0,3	+	-	-	-
Extracto en detergente de Eritrocito	0,3	0,3	0,3	-	+	+	-
Membranas N.Crassa Cepa StL74 + Extracto en detergente de Eritrocito	3,0	19,0	90,0	+	+	+	+
Membranas N.Crassa Cr-1 + Extracto en de- tergente de Eritrocito	0,5	0,4	0,4	-	+	+	+
Membranas N.Crassa Cepa StL74, calentadas + Extracto en detergente de Eritrocito	0,3	0,3	0,3	-	+	+	?
Adenil Ciclasa Soluble N.Crassa + Extracto en detergente de Eritrocito	1,8	1,5	1,5	+	+	+	-
Adenil Ciclasa Soluble Testículo + Extracto en Detergente de Eritrocito	0,4	0,5	0,4	+	+	+	-

Tabla XII. Requerimientos para la obtención de un sistema de reconstitución efectivo. Las mezclas de reacción de membranas de N.crassa, StL74, membranas de N.crassa, cr-1, extracto en colato de eritrocitos tratados con toxina del cólera, adenil ciclasa soluble de N.crassa o adenil ciclasa soluble de testículo, tienen 85, 86, 75, 300 o 190 ug de protefna respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Las concentraciones de isoproterenol, GppNHp y fluoruro en las mezclas fueron 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-2</sup>M respectivamente.

origen de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Es decir, si los efectos obtenidos son producto de uniones específicas al verdadero receptor, o si son debido a uniones no específicas a la membrana. Para ello se midió la unión ("binding") del (-) [ $^3\text{H}$ ] dehidroalprenolol a membranas de eritrocito y de Neurospora y a extractos en detergentes. El binding específico solamente se observó en las preparaciones provenientes de eritrocito (figura 31).

V-3. Variación de la actividad enzimática en el sistema reconstituido en presencia de diversos efectores.

En la figura 32 y 33 se muestran las variaciones de la actividad de la adenil ciclasa, con el tiempo, en los sistemas reconstituidos a partir de membranas de N.crassa y extractos en colato de membranas de eritrocito de pavo no tratadas y tratadas con toxina del cólera, respectivamente. Las velocidades de reacción fueron proporcionales al tiempo de incubación-

En el sistema reconstituido, en el que se utilizaron extractos provenientes de membranas no tratadas con toxina, los efectos estimulatorios se observaron con isoproterenol más Gpp(NH)p o fluoruro. En el sistema que fue tratado con toxina, la actividad enzimática fue comparativamente mayor y además el Gpp(NH)p estimuló en ausencia de isoproterenol.

V-4. Variación de la actividad enzimática del sistema reconstituido por las diferentes concentraciones de extracto en colato utilizados en el ensayo.

Las variaciones de actividad enzimática del sistema reconstituido fue medido ante los diferentes efectores, como una función de la concentración de extracto en colato.

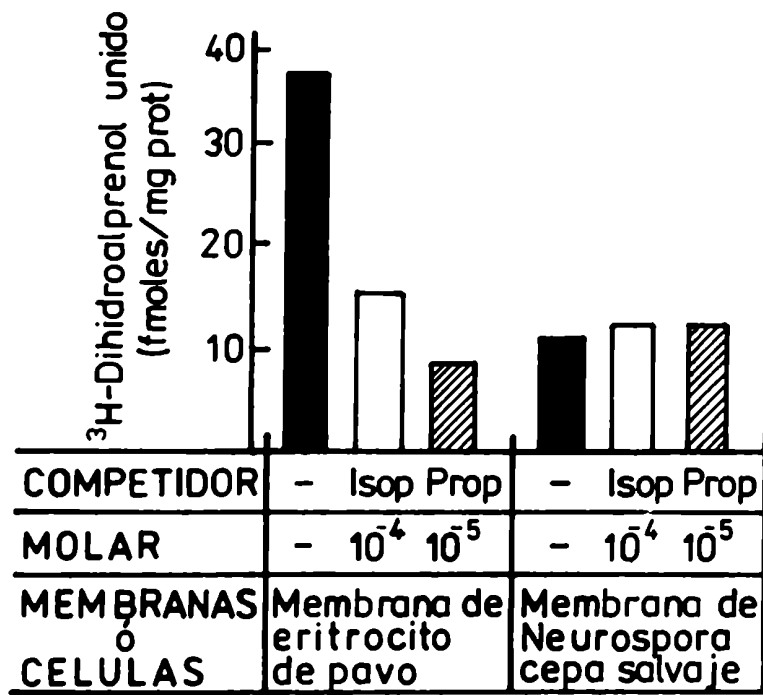


Figura 31. Medida del "binding" de (-) [<sup>3</sup>H] dehidroalprenolol a membranas de eritrocito de pavo, a extractos en detergente de los mismos y a N.crassa.

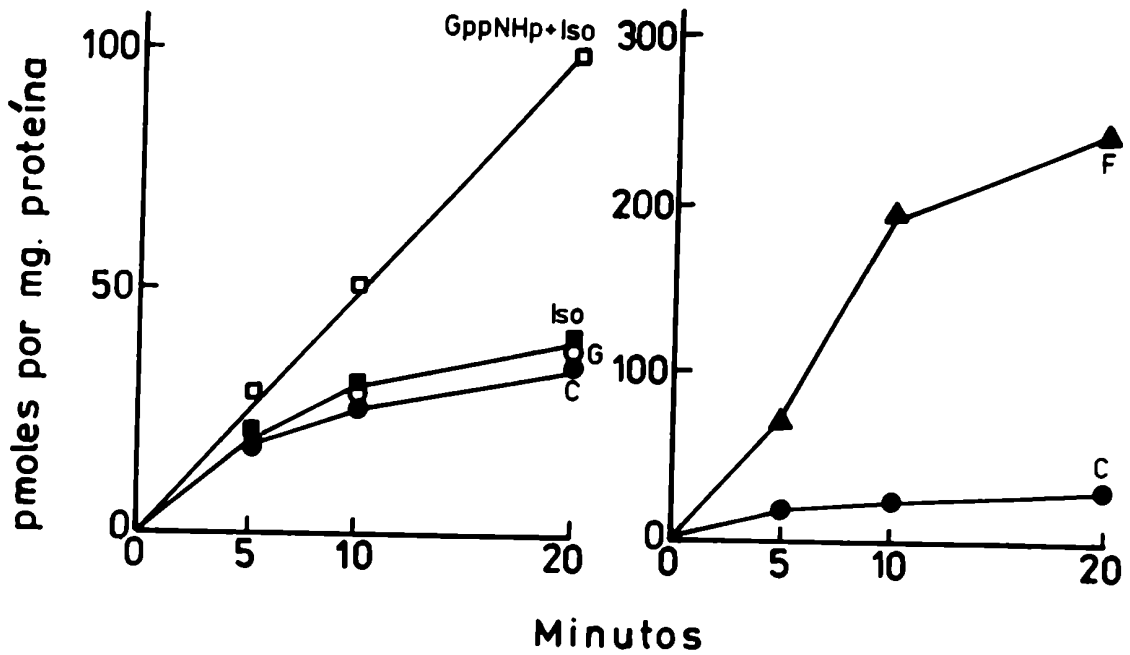


Figura 32. Medida de la actividad de adenil ciclasa en función del tiempo, en un sistema reconstituido que contiene membranas de *N. crassa* StL 74 (215  $\mu\text{g}$  de proteína) y un extracto en colato de membranas de eritrocito no tratadas con toxina del cólera (125  $\mu\text{g}$  de proteína). Las mezclas fueron suplementadas con: (●) nada; (●) Gpp(NH)p  $10^{-6}\text{M}$ ; (■) Isoproterenol  $10^{-6}\text{M}$ ; (□) Isoproterenol más Gpp(NH)p, ambos  $10^{-6}\text{M}$  ó (▲) Fluoruro  $10^{-2}\text{M}$ .

En la figura 34 se pueden observar los resultados experimentales. Se ve que en presencia de isoproterenol más Gpp(NH)p o fluoruro, al aumentar la concentración de extracto, el sistema tiende a saturarse, mientras que la actividad basal mantiene su proporcionalidad con el aumento de extracto.

V-5. Efecto del isoproterenol y el fluoruro en el sistema reconstituido en presencia de Gpp(NH)p.

En la figura 35 se muestran las variaciones de la acti-

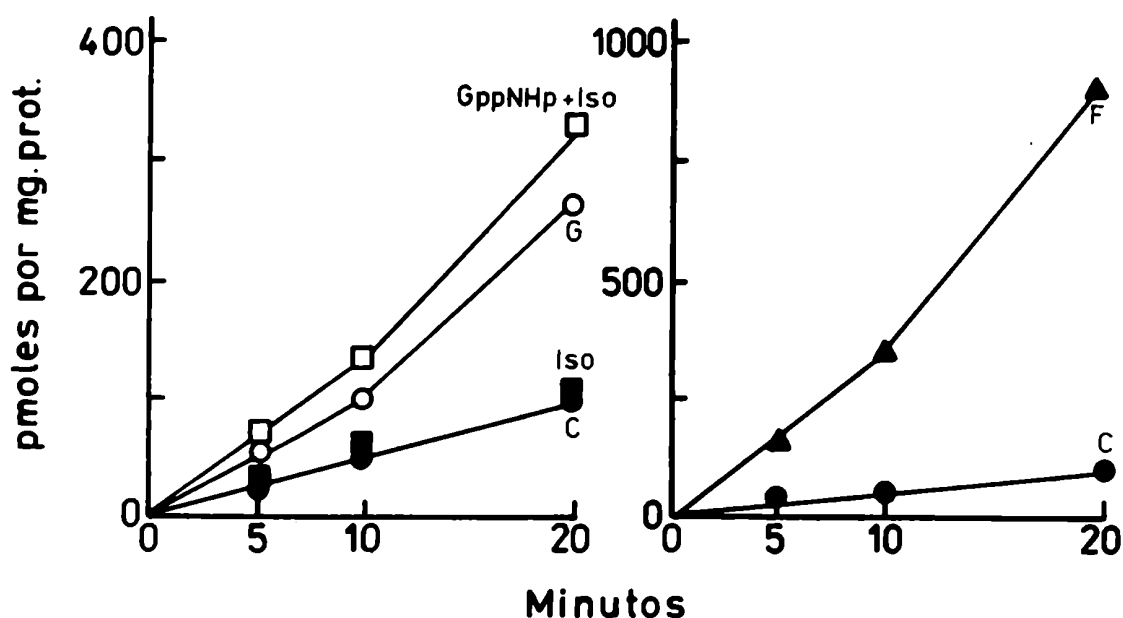


Figura 33. Medida de la actividad de adenil ciclasa en función del tiempo, en un sistema reconstituido que contiene membranas de *N. crassa* St L 74 (230  $\mu\text{g}$  de protefna) y un extracto en colato (125  $\mu\text{g}$  de protefna) previamente tratados con toxina del cólera. Los símbolos son similares que en la figura 31.

vidad de adenil ciclasa en el sistema reconstituido, medida en presencia de Gpp(NH)p  $10^{-7}\text{M}$ , como una función de la concentración de isoproterenol. La estimulación resultó ser saturable, alcanzando la mitad de la máxima estimulación a  $10^{-7}\text{M}$  de isoproterenol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aurbach y colaboradores (239) en membranas de eritrocito de pavo.

En la figura 36 se observan las variaciones de actividad del sistema reconstituido en función del fluoruro. Estos

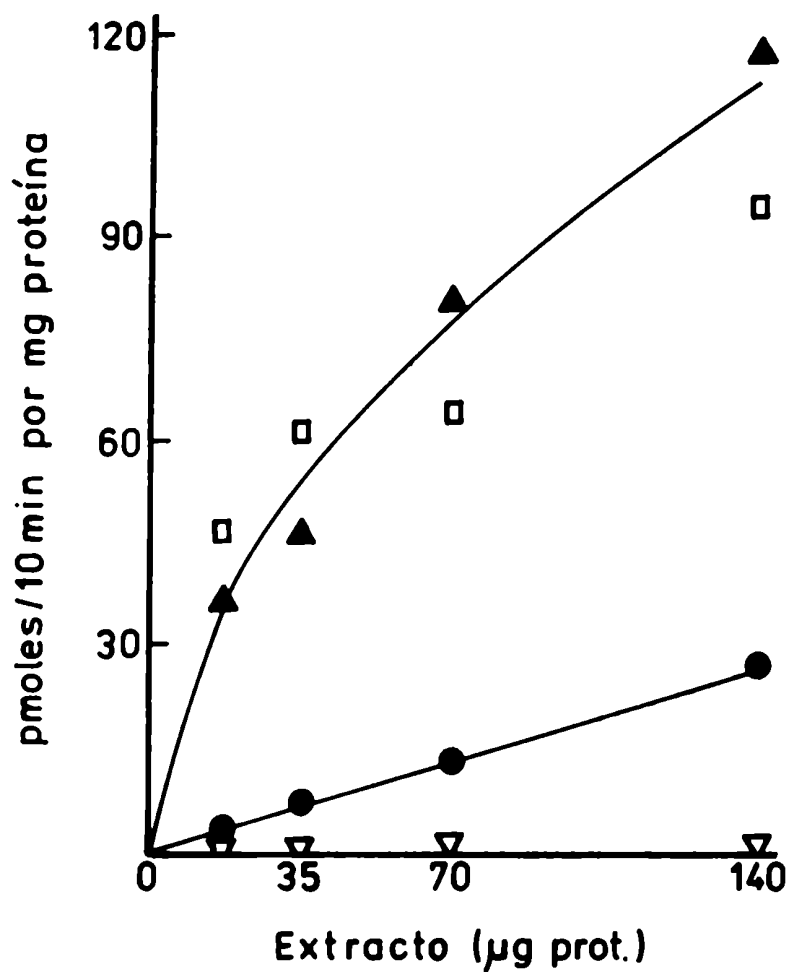


Figura 34. Actividad de adenil ciclasa en función de la concentración de extracto en colato de las membranas de eritrocito. Condiciones y símbolos, ver figura 32.

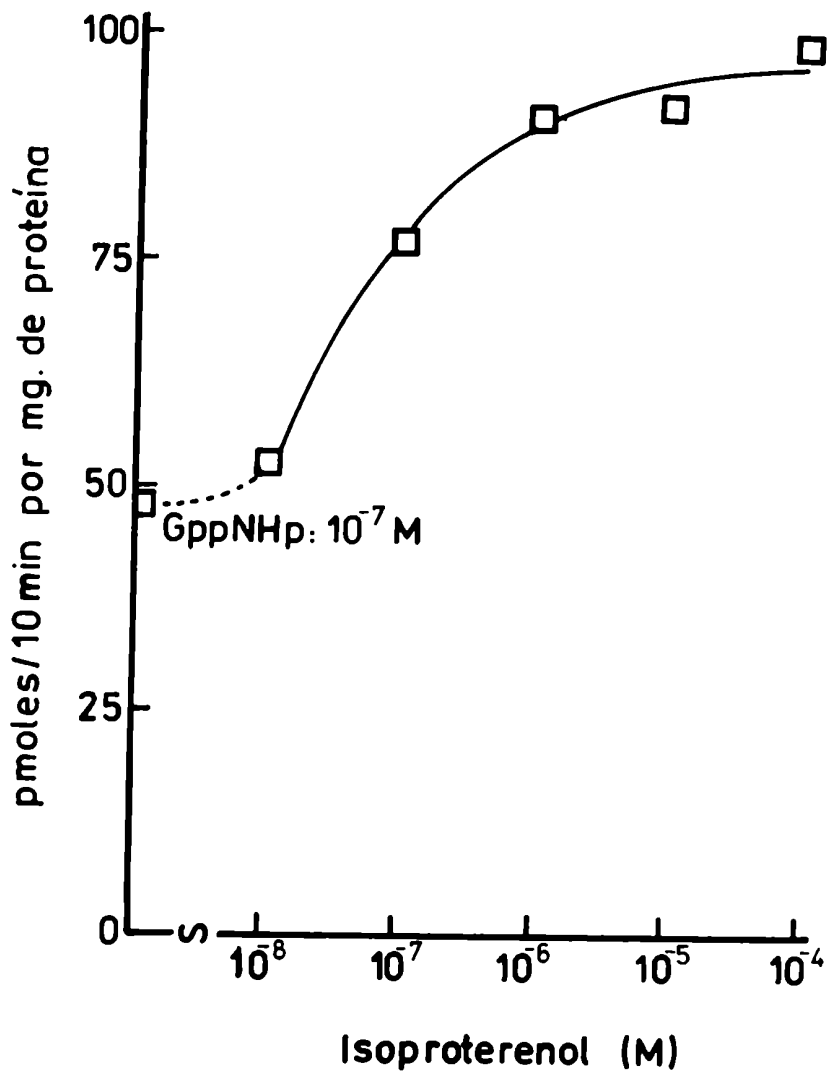


Figura 35. Actividad de adenil ciclasa en un sistema reconstituido como función de la concentración de Isoproterenol. Membranas de N.crassa St L 74 (215  $\mu$ g de proteína) se mezclaron con extracto en colato (120  $\mu$ g de proteína) de membranas de eritrocito no tratadas con toxina. La mezcla se suplementó con Gpp(NH)p 10<sup>-7</sup>.

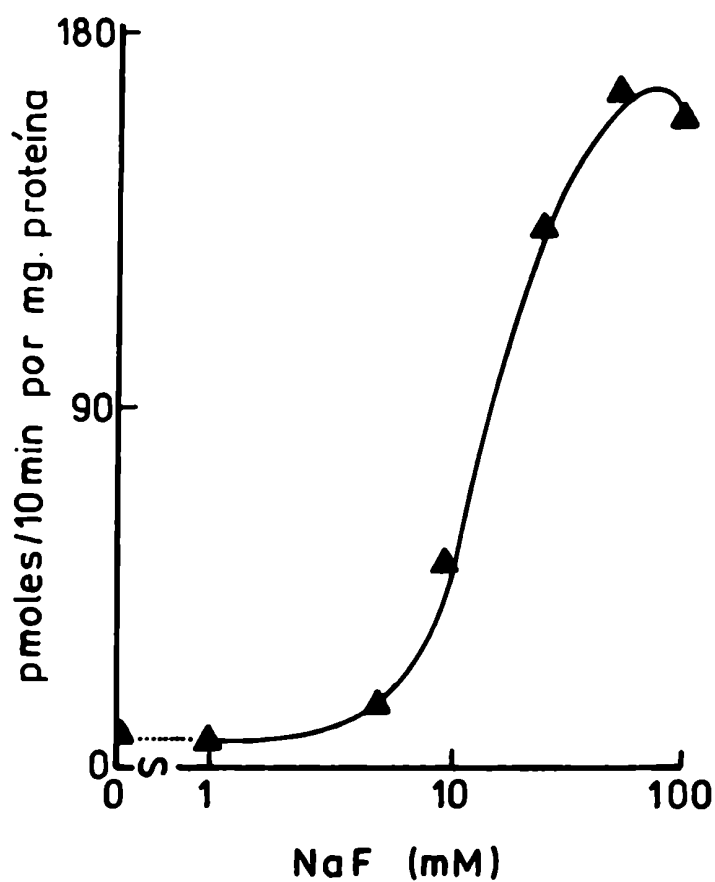


Figura 36. Actividad de adenil ciclasa en un sistema reconstituído como función de la concentración de fluoruro. Membranas de *N.crassa* St L74 (250  $\mu$ g de proteína) se mezclaron con extracto de colato (100  $\mu$ g de proteína) de membranas de eritrocito no tratadas con toxina.

incrementos ocasionados por el ión son similares a los obtenidos para el sistema de adenil ciclasa de hígado (240).



V-6. Reconstitución de la actividad de adenil ciclasa dependiente de  $Mg^{2+}$  en membranas de *N. crassa* utilizando extractos de membranas de eritrocito pretratadas con toxina del cólera y [ $^{14}C$ ]NAD.

Para confirmar que la reconstitución se llevó a cabo a través de la interacción del componente N, proveniente de las membranas de eritrocito, con el componente C de las membranas de *N. crassa*; se trataron las membranas de eritrocito con toxina del cólera y [ $^{14}C$ ]NAD, tal como se describe en el apartado XIII-2 de "Materiales y Métodos". De esta manera, por ADP ribosilación (apartado II de Introducción) se "marca" con  $^{14}C$  el componente N. Posteriormente se solubilizó con digitonina, la cual inactiva el componente C. Obtenido un extracto con digitonina, se lo cromatografió en una columna de Ultragel AcA34, ver apartado XIV-3, de "Materiales y Métodos". El perfil de elución de la columna puede observarse en la figura 37, en el cual el pico de radioactividad se ubicó en un peso molecular correspondiente a 30-35.000D. Cada una de las fracciones se reconstituyó con membranas de *N. crassa* y se midió actividad en presencia de  $Mg^{2+}$ . Las fracciones en las que se encontró actividad enzimática, coincidieron con la radioactividad, de manera tal que se puede decir que la reconstitución del sistema se lleva a cabo entre el componente N de eritrocito y la unidad catalítica de *N. crassa*.

V-7. Discusión.

En este apartado se demuestra que las membranas de la cepa salvaje de *N. crassa*, son capaces de interaccionar con componentes regulatorios provenientes de extractos en detergentes de membranas de eritrocitos de pavo.

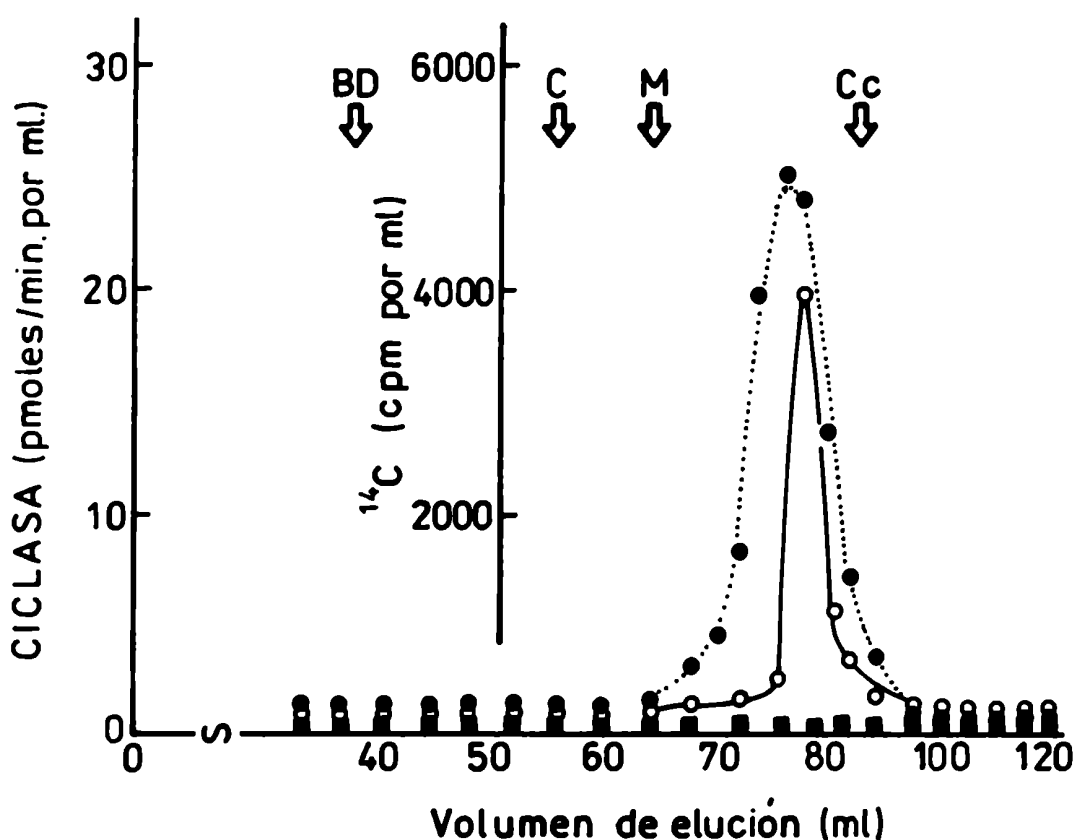


Figura 37. Perfil de elución de una cromatografía en Ultragel AcA 34 de un extracto en digitonina al 1% de membranas de eritrocito, previamente tratadas con toxina del cólera y [<sup>14</sup>C]NAD.

(●), radioactividad; (o), actividad de adenil ciclasa en presencia de Mg<sup>2+</sup>.

Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: BD, azul de dextrano; C, catalasa; M, malato deshidrogenasa y Cc, citocromo C.

Como resultado de tal interacción, se reconstituye el sistema de la adenil ciclasa, el cual es catalíticamente activo en presencia de  $Mg^{2+}$  y es activado por Gpp(NH)p más Isoproterenol o fluoruro o por toxina del cólera.

Es importante destacar que, para obtener un sistema funcionalmente activo, se requiere: 1) una entidad catalítica, dada por las membranas de N. crassa, cepa salvaje; 2) un receptor y una entidad regulatoria, que se hallan en los extractos en detergentes de membranas de eritrocito y 3) membranas. Las membranas de N. crassa, catalíticamente inactivas, tales como las de mutante cr-1 o membranas calentadas no son capaces de brindar un sistema reconstituido activo. Esto está indicando que la reconstitución es una consecuencia de la interacción entre la adenil ciclasa de N. crassa y algunos componentes existentes en los extractos en detergentes y no una reactivación de la actividad enzimática de tales extractos, por causas tales como la interacción con los lípidos de la membrana. Esta última posibilidad ha sido analizada recientemente por Hebdon y colaboradores (238).

Estos experimentos ponen además en evidencia que las membranas son un componente fundamental en la reconstitución, ya que preparaciones de adenil ciclasa soluble de N. crassa y de testículo de rata, no reconstituyen un sistema activo.

Otro punto a considerar es, la respuesta hormonal en el sistema reconstituido. Por experimentos de "binding: se demostró que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son proporcionados por los extractos y no por la membrana de N. crassa. En la literatura existen muchas evidencias de que en otros sistemas ocurre lo mismo (241) (242).

Se puede observar, por otro lado, que el sistema heterólogo reconstituido (Neurospora-Ave) muestra una curva dosis-respuesta para isoproterenol similar a la que se obtiene en un sistema homólogo como es el de membranas de eritrocitos

aviarios (241).

En los sistemas heterólogos, la formación de un complejo ternario, receptor-N-C, parece ser esencial, si se utilizan extractos en detergentes de membranas no tratadas con toxina del cólera. En caso de emplearse para la reconstitución membranas previamente tratadas con la toxina, parece que la formación de un complejo binario, N-C, es requerida para la activación enzimática.

Según el modelo propuesto por Cassel y Selinger (figura 4), la acción hormonal es importante a nivel del recambio de GDP por GTP en el componente regulatorio, de esta manera favorece la reactivación del sistema. Cuando las membranas no son tratadas con toxina del cólera, la estimulación por el nucleótido de guanosina, requiere la presencia del isoproterenol. Esto se debe a que el GDP u otro nucleótido, se hallan fuertemente unido al componente N y por ello es necesaria la acción hormonal para su recambio (efecto heterotrópico negativo). Sin embargo, si las membranas son tratadas con toxina del cólera, no se necesita del efecto hormonal. Estos resultados indican, que dicha toxina no sólo inhibe la actividad GTPásica, sino también favorece el recambio de nucleótidos del sitio regulatorio del componente N. Hay que destacar que el mecanismo por el cual la hormona ejerce su efecto, debe ser diferente, pues el Isoproterenol es capaz de estimular la adenil ciclase en presencia de Gpp(NH)p de membranas pretratadas con toxina del cólera.

#### VI. Experimentos de fusión entre membranas de T. cruzi y componente regulatorio de membranas de hígado de rata.

Schramm (243) demostró que la adenil ciclase podía ser inactivada en células intactas por tratamiento N-etilma-

leimida (NEM), mientras los receptores de catecolaminas permanecían intactos. Posteriormente estos receptores pudieron ser acoplados a la adenil ciclasa de otras células, mediante la fusión mediada por virus Sendai. En forma similar se logró transferir el receptor de prostaglandina  $E_1$  (244). Estos experimentos confirmaron que los receptores hormonales existen en la membrana celular como entidades independientes de la adenil ciclasa.

Actualmente, se ha dejado de lado la utilización del virus Sendai para fusionar y en su reemplazo se emplea el PEG, cuyo empleo ha sido exitoso en experimentos de transferencia de diferentes tipos de receptores luego de operado el fenómeno de fusión de membranas (245).

En este apartado se muestran los resultados obtenidos al transferir receptor de glucagón de membranas de hígado purificadas a membranas de T. cruzi, las cuales poseen una actividad de adenil ciclasa insensible a hormonas.

Los detalles experimentales fueron desarrollados en la sección XVI de "Materiales y Métodos". El esquema seguido en el procedimiento se muestra en la figura 22.

#### VI-1. Actividad de adenil ciclasa en preparaciones de T.cruzi e hígado de rata.

En la tabla XIII se pueden observar las actividades enzimáticas de las membranas de hígado, tratadas o no con NEM y de membranas de T.cruzi y el correspondiente extracto en digitonina.

Las membranas de hígado presentaron en presencia de  $Mg^{2+}$  una respuesta apreciable al glucagón y más aún al fluoruro. Por el contrario, no se observó actividad de adenil ciclasa en las membranas tratadas con NEM. En las membranas de

ADICIONES	COMPONENTES			ACTIVIDAD ADENIL CICLASA (Mg <sup>2+</sup> ) pmoles/min/mg. prot.		
	Membrana	N-R	C	Basal	Glucagón + Gpp(NH)p	F <sup>-</sup>
Membranas de hígado	+	+	+	5,0	28,0	70,0
Membranas de hígado-NEM	+	+	-	0,8	0,8	0,6
Membranas de <u>T.cruzi</u>	-	-	+	4,8	4,0	5,1
Extracto en digitonina de <u>T. cruzi</u>	-	-	+	5,0	4,6	5,2
Membranas de <u>T.cruzi</u> + Membranas de hígado-NEM	+	+	+	9,0		
Extracto en digitonina de <u>T.cruzi</u> + Membranas de hígado-NEM.	-	+	+	5,1	5,2	4,5

Tabla XIII. Actividades de adenil ciclasa, medidas en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Las mezclas de reacción de membranas de hígado, membranas de hígado tratadas con NEM, membranas de T.cruzi o extracto en digitonina de membranas de T. cruzi, contienen 429, 250, 270 y 130 ug de proteína respectivamente. Las concentraciones de glucagón, Gpp(NH)p y fluoruro en las mezclas fueron 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-2</sup> respectivamente.

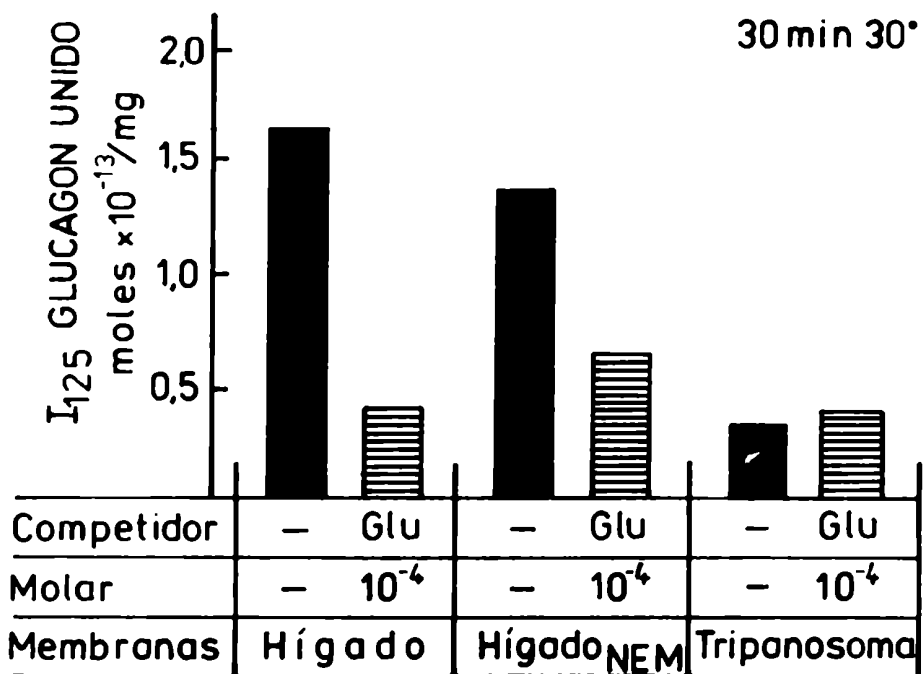


Figura 38. Medida del "binding" del  $[I^{125}]$ glucagón a las membranas de hígado de rata, membranas de *T.cruzi* y su correspondiente extracto en digitonina. El desplazamiento se hizo con glucagón "frío"  $10^{-4}M$ .

T. cruzi o su extracto en digitonina no se observó estimulación por glucagón o fluoruro. Cuando se fusionaron ambos tipos de membranas se obtuvo una estimulación considerable en presencia de glucagón más Gpp(NH)p o fluoruro. Sin embargo estos efectos no se lograron reemplazando las membranas de T.cruzi por extractos en digitonina de las mismas. Esto está indicando el requerimiento de ambas membranas para la transferencia efectiva del receptor.

Schramm (216) encontró que su sistema no solo requiere de dos tipos de membranas, sino también la presencia en el medio de reacción de fosfolípidos. En los experimentos de este autor la adición de los fosfolípidos resultó ser importante, pues mejoró la eficiencia de la fusión entre membranas de hígado y células de la eritroleucemia de Friend.

En el sistema que se discute en este apartado, la presencia de fosfolípido no modificó los resultados expuestos.

Para destacar posible reactivación de la actividad adenil ciclasa por parte de las membranas de hígado, se realizaron fusiones entre las mismas, pero en ningún momento se detectó actividad mayor que las que ellas poseían previamente a la fusión (resultados no mostrados).

También se estudió la posibilidad de que la respuesta producida por el glucagón en el sistema heterólogo fuera debido a un efecto inespecífico. Para ello se midió el "binding" del glucagón a las membranas de T.cruzi. Como se puede observar en la figura 38, la unión de la hormona radioactiva a las membranas de T.cruzi es muy baja y no es desplazable por exceso de hormona fría. Esto indicaría que la respuesta del sistema al glucagón, es debida a los receptores específicos existentes en las membranas de hígado.



VI-2. Variación de la actividad enzimática en las membranas utilizadas y en el sistema reconstituido, en presencia de diversos efectores.

En la figura 39 se muestra la actividad de adenil ciclasa en función del tiempo, en las membranas de hígado y de T.cruzi. En el primer caso, se midió la actividad basal o en presencia de glucagón más Gpp(NH)p o fluoruro, mientras que en las otras membranas las actividades fueron medidas con  $Mn^{2+}$  y con  $Mg^{2+}$ . Como puede observarse, las membranas de hígado tuvieron una respuesta proporcional al tiempo no sólo en su actividad basal sino también en presencia de los diferentes efectores. En cuanto a las membranas de T.cruzi se puede ver que la actividad con  $Mg^{2+}$  es aproximadamente el 0,5% de la medida con  $Mn^{2+}$ . Estos resultados están de acuerdo con la literatura e indican que no se puede descartar la presencia de un componente regulatorio (N) responsable de esa actividad dependiente de  $Mg^{2+}$ . En caso de ser afirmativo, dicha proteína debe ser bastante rudimentaria pues el porcentaje de actividad es muy bajo, además de no presentar variaciones por el agregado de diferentes efectores. En la figura 40 se pueden observar las actividades en los sistemas originados por la fusión de membranas de hígado y T.cruzi. Las mismas resultaron proporcionales al tiempo de ensayo, no sólo en cuanto a la actividad basal, sino también cuando se le agregó fluoruro o glucagón más Gpp(NH)p. De la misma manera se comportó el sistema, cuando se utilizaron membranas de hígado pretratadas con toxina del cólera. En este caso, sin embargo, los niveles de actividad alcanzados fueron mayores (figura 40').

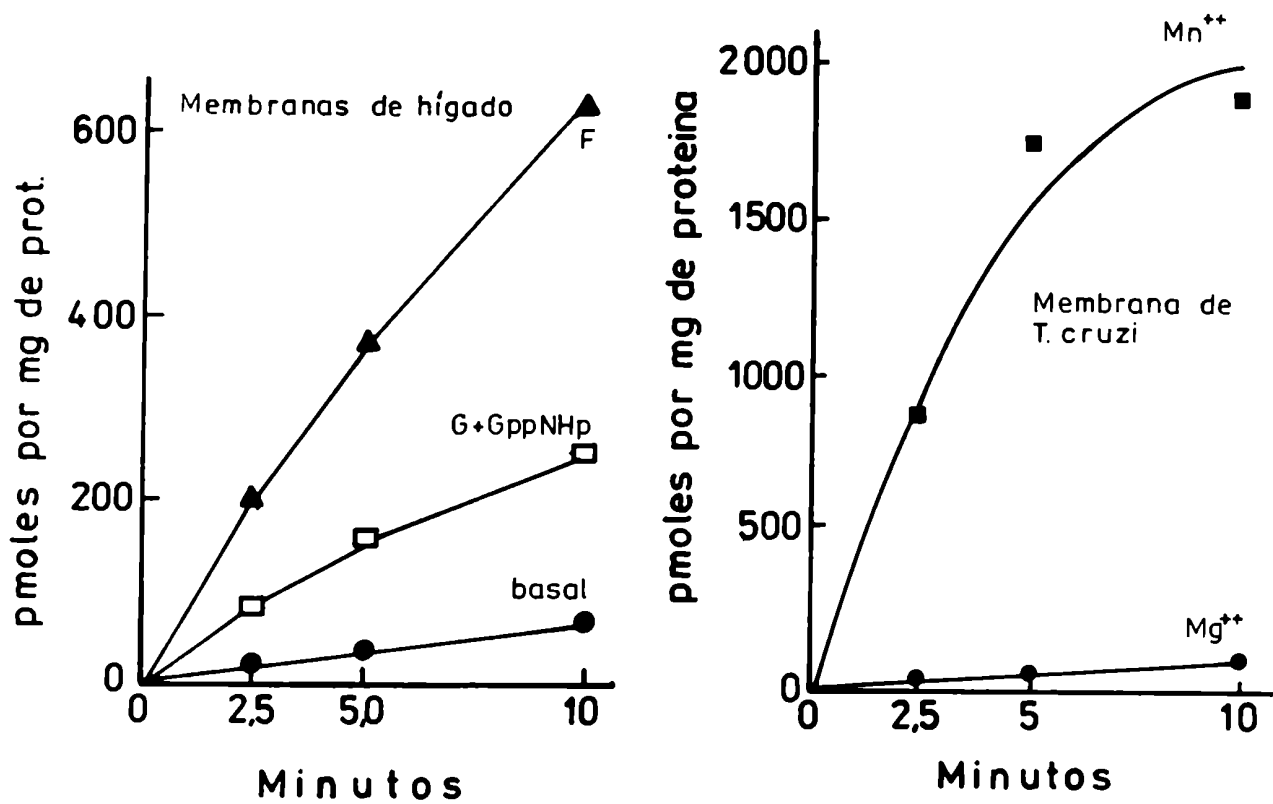


Figura 39. Medida de la actividad de adenil ciclasa, en función del tiempo, en membranas de hígado de rata y en membranas de T.cruzi (270  $\mu$ g de proteína). Las mezclas de reacción, para las membranas de hígado, fueron suplementadas con: (●), nada; (◻), glucagón más Gpp(NH)p, ambos  $10^{-6}$ M o (▲), fluoruro,  $10^{-2}$ M. Las membranas de T.cruzi fueron medidas en presencia de (■)  $Mn^{2+}$  o (●)  $Mg^{2+}$ .

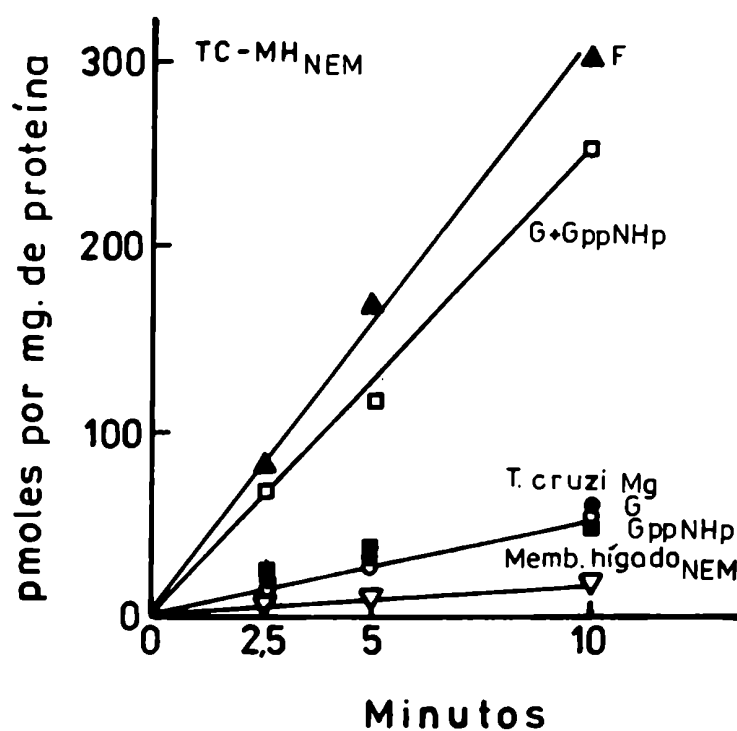


Figura 40. Medida de la actividad de adenil ciclasa, en función del tiempo, en el sistema originado por fusión de membranas de T. cruzi y de hígado. Los símbolos y condiciones son similares a los de la figura 39.

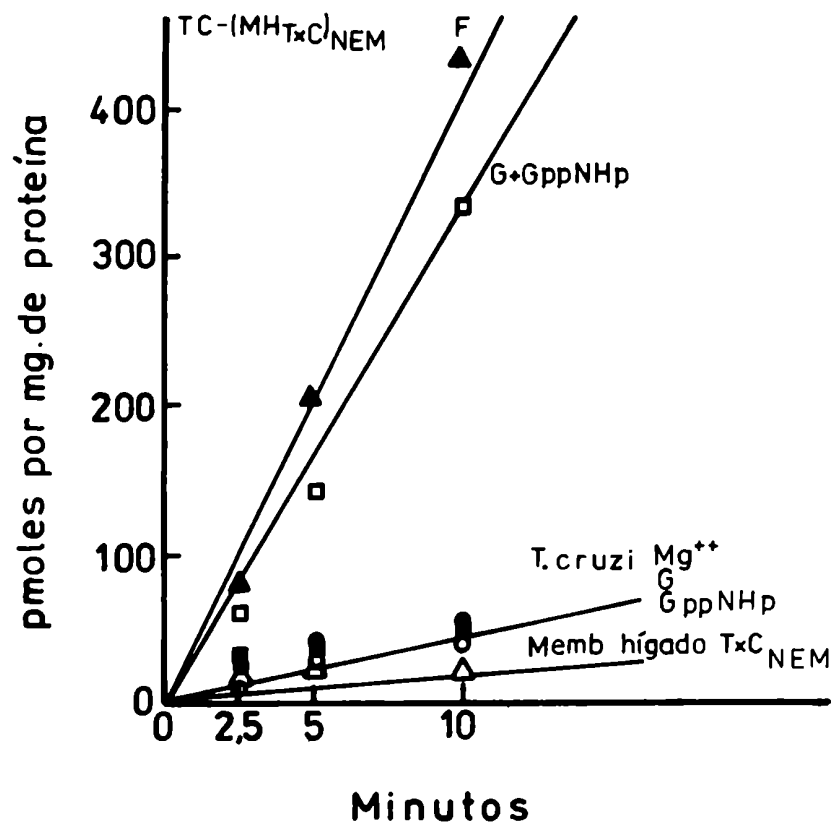


Figura 40' Medida de la actividad de adenil ciclasa, en función del tiempo, en el sistema originado por fusión de membranas de *T.cruzi* y de hígado tratadas con toxina del cólera. Los símbolos y condiciones son similares a los de la figura 39.

VI-3. Efecto del ión fluoruro en el sistema originado por fusión.

En la figura 41 se pueden ver las variaciones de la actividad de adenil ciclasa como una función de la concentración de fluoruro; el sistema tiende a saturarse a una concentración de anión igual a 100mM.

VI-4. Efecto del glucagón en el sistema originado por fusión en presencia de Gpp(NH)p.

Las variaciones de actividad enzimática del sistema fueron medidas en presencia de Gpp(NH)p  $10^{-5}$ M, como una función de la concentración de glucagón. En la figura 42 se muestra el comportamiento del sistema, el cual es saturable y alcanza la mitad de la estimulación máxima a  $10^{-6}$ M de glucagón.

VI-5. Discusión.

Los experimentos desarrollados en esta sección permiten demostrar que mediante la fusión de membranas de diferentes orígenes como son las de hfgado de rata y T.cruzi, se produce la interacción de componentes proteicos presentes en los diferentes soportes. Es decir, la difusión lateral a través de las membranas, permite que estas se complementen y así es que el receptor de glucagón y el componente regulatorio proveniente de las membranas de hfgado interactúan con la subunidad catalítica de T.cruzi, confiriéndole a la enzima las características de una adenil ciclasa sensible a hormonas.

Los trabajo de Citri y Schramm (246) enfatizaron el concepto de que los receptores y el componente N pueden moverse sobre el plano de la membrana, gracias a la fluidez de la misma, interactuando así con el componente catalítico.

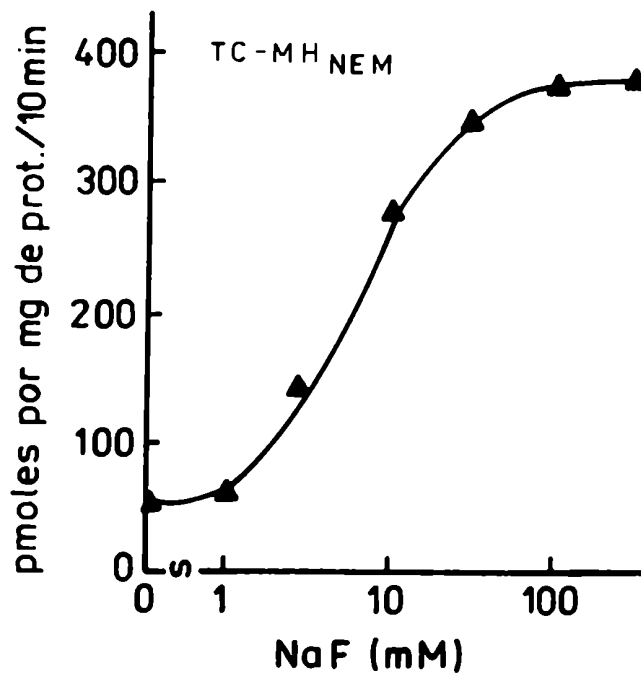


Figura 41. Actividad de adenil ciclase en un sistema originado por la fusión de membranas de T. cruzi y de hígado, como una función de la concentración de fluoruro.

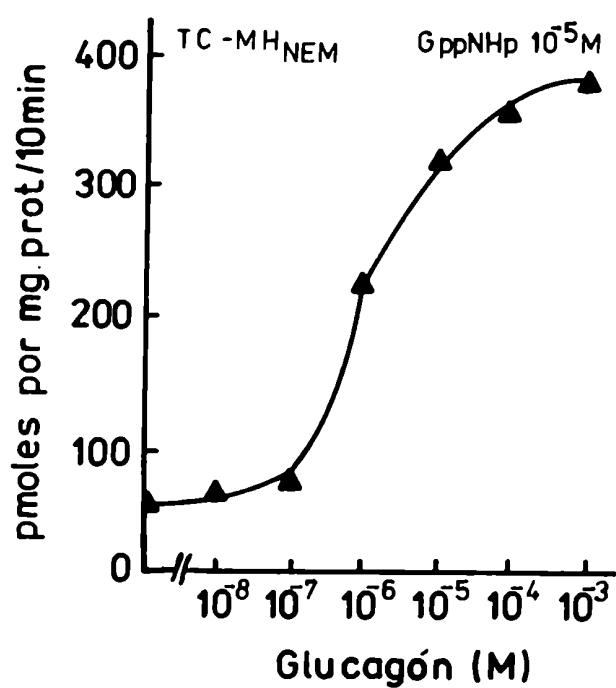


Figura 42. Actividad de adenil ciclase en un sistema originado por fusión de membranas de *T.cruzi* y de hígado, como una función de la concentración de glucagón. Medida en presencia de Gpp(NH)p 10<sup>-5</sup>M.

Como se puede apreciar en los diferentes experimentos, los niveles de actividad de adenil ciclasa, en el sistema originado por fusión, superan notablemente los de las membranas de hígado. Esto estaría indicando que las membranas de T.cruzi ofrecen la sistema un gran número de subunidades catalíticas. Por tanto en hígado la actividad estaría limitada por la oferta de C y por la de los factores regulatorios. Los resultados obtenidos en el apartado anterior y en éste, constituyen la primera evidencia de que la adenil ciclasa de un organismo eucariote inferior es capaz de reconocer componentes reguladores del sistema adenil ciclasa de vertebrados. Esto podría indicar que evolutivamente la subunidad catalítica de la adenil ciclasa fue adicionando componentes reguladores, manteniéndose la entidad catalítica sin variaciones importantes. En este sentido es notable la similitud entre las subunidades catalíticas de eucariotes superiores y la enzima de N.crassa.

#### VII. Anticuerpos monoclonales para adenil ciclasa de N.crassa.

Los anticuerpos monoclonales presentan ciertas características respecto de los policlonales que favorecen su utilización experimental. En este sentido las ventajas en la utilización de los primeros puede resumirse como sigue:

- Los títulos son generalmente altos.
- La fuente de obtención de anticuerpos es ilimitada.
- Los anticuerpos son homogéneos, aunque el antígeno utilizado en la inmunización es de baja pureza.
- No presentan la imposibilidad de reproducir, en un nuevo



animal, la combinación de anticuerpos previamente obtenida (247). Hecho que es propio de los anticuerpos policlonales.

La obtención de anticuerpos monoclonales contra la adenil ciclasa de Neurospora crassa, se realizó como se especificó en el apartado XVII de "Materiales y Métodos".

Luego de haber transcurrido aproximadamente un mes de la fusión, se ensayaron los medios de cultivo de los hibridomas, para comprobar si estaban o no secretando inmunoglobulinas, posterior a la positividad de este ensayo, para luego determinar si algunos de estos anticuerpos secretados reaccionaban con la adenil ciclasa específicamente. Como se puede ver en la tabla XIV en los diferentes clones ensayados se tuvieron distintos porcentajes de inhibición de la actividad enzimática respecto del control correspondiente. La mayoría de los medios ensayados produjeron inhibiciones del 7 al 22% de la actividad. Sin embargo, los medios procedentes de los llamados clon 2, 12, 30, 90 y 91 inhibieron la adenil ciclasa entre 49-58%.

El medio proveniente del clon 90, originó la máxima inhibición, por tal motivo fue seleccionado para su reclonaje por dilución límite y para realizar los experimentos que se describen a continuación.

El efecto inhibitorio del clon seleccionado fue aumentando paulativamente desde un 58% hasta llegar al 100%.

Como se puede observar en la figura 43A, el medio del clon 90 originó un efecto inhibitorio dosis-dependiente; es decir que aumentando la cantidad de medio presente en el ensayo, se alcanzó hasta un 80% de inhibición de la actividad enzimática. Además, este efecto fue aumentando a medida que se incrementaba el tiempo de preincubación del medio con la preparación de adenil ciclasa; este comportamiento se muestra

MEDIO	VOLUMEN (ul)	TIEMPO DE PREINCUBACION (min)	ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA (pmol/min/mg.prot.)	INHIBICION (%)
Clon 2	20	180	306	49
Clon 12	20	180	252	58
Clon 30	20	180	270	55
Clon 90	20	180	252	58
Clon 91	20	180	270	55
Clon 6	20	180	558	7
Clon 22	20	180	468	22
Clon 82	20	180	498	17
Control	20	180	516	14
Nada	-	180	601	-

Tabla XIV. Inhibición producida por diferentes clones sobre la actividad de adenil ciclasa de N. crassa. Las condiciones del ensayo son las indicadas en el texto.

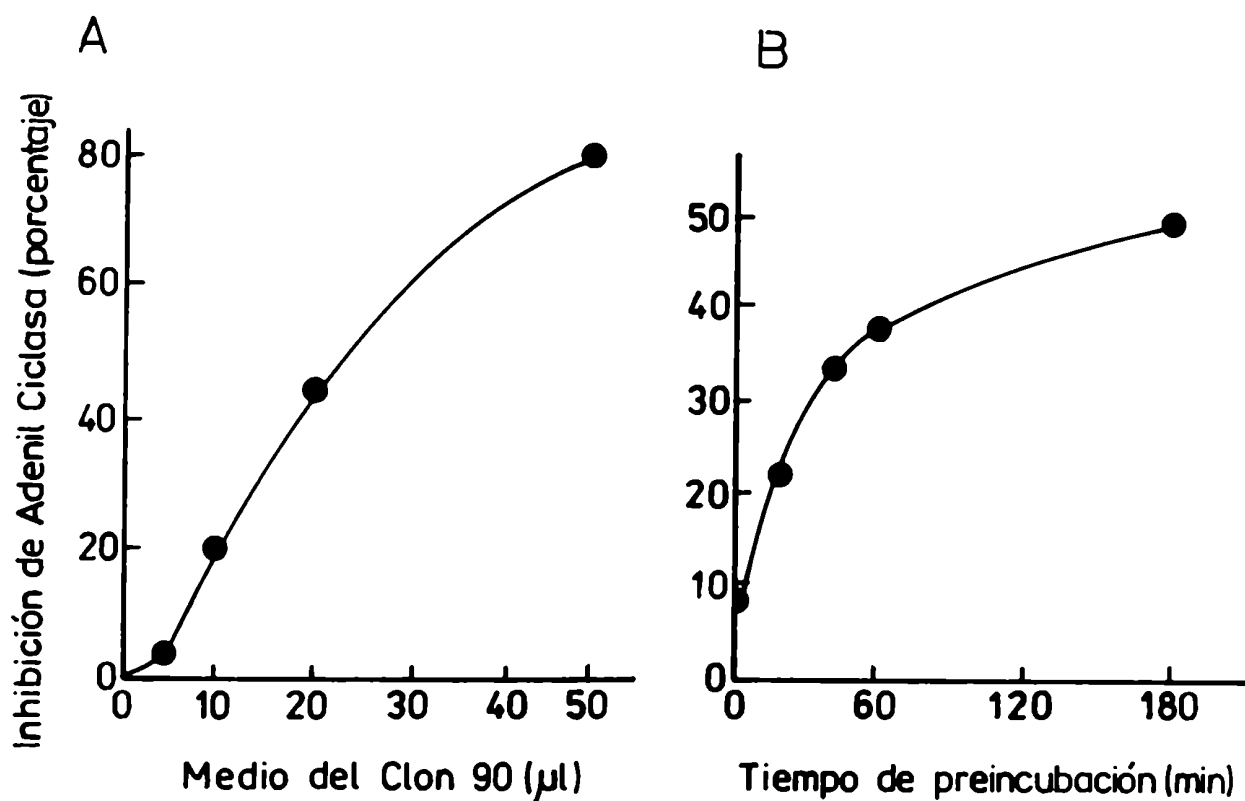


Figura 43. Variación de la inhibición de la actividad de adenil ciclasa de *N.crassa*, con el aumento de la cantidad de medio del clon 90 presente en el ensayo (A) y en función del tiempo de preincubación de la mezcla (B). 20 µl de la preparación enzimática se preincubaban con cantidades variables de anticuerpo durante 180 minutos a 22°C o 20 µl de la preparación enzimática se preincubaron con 30 µl de medio, durante tiempos variables a 22°C. Posteriormente, en la mezcla se determinó la actividad enzimática.

en la figura 43B, en la cual se ve que alcanza una inhibición máxima a los 180 minutos de preincubación.

Para descartar toda posibilidad de que se deba a una inhibición inespecífica, se pretrató el medio proveniente del clon 90 con antisuero de ratón producido en conejo. Se puede observar en la tabla XV que el efecto inhibitorio desaparece.

Estos resultados, sugieren que el efecto inhibitorio del clon 90 es realmente debido a una reacción antígeno-anticuerpo y descarta la existencia de un efecto inespecífico del medio.

Se probó además, el efecto del anticuerpo sobre adenil ciclasas de otros sistemas, dependientes de  $Mn^{2+}$ , a saber; Mucor rouxii y Trypanosoma cruzi, asociadas a membranas; Neurospora y testículo de rata, ambas solubles, como así también la adenil ciclasa asociada a membranas de eritrocito de pavo, dependiente de  $Mg^{2+}$ . En la tabla XVI se observaron inhibiciones variables en la actividad enzimática proveniente de organismos eucariotes inferiores pero no en las preparaciones enzimáticas de testículo de rata o eritrocito de pavo.

Este anticuerpo se caracterizó por inmunolectroforesis, utilizando los antisueros correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulinas, los detalles experimentales fueron especificados en el apartado XVII-8 de "Materiales y Métodos". En la figura 44 se puede observar la inmunolectroforesis utilizando como antisuero anti Ig G de ratón. En estas condiciones se observó una banda de precipitación única.

Según los resultados anteriores, se procedió a purificar la inmunoglobulina según el protocolo de purificación correspondiente a una inmunoglobulina del tipo G. Utilizando como fuente de anticuerpo el medio de cultivo, se realizó una precipitación al 50% (P/V) con solución saturada de  $SO_4(NH_4)_2$ . Posteriormente, se dializó y sembró en una columna de DEAE-celulosa la cual se equilibró de manera tal, que las Ig G per-

Medio	Volumen ( $\mu$ l)	Tiempo de preincubación (min)	Actividad de adenil ciclasa pmol/min/mg.prot.	Inhibición (%)
Control	20	180	337	-
Clon 90 (tratado con suero de conejo anti-ratón)	equivale 20	180	350	-
Clon 90 (tratado con suero normal de ratón)	equivale 20	180	117	65

Tabla XV. Resultado sobre la inhibición de la actividad de adenil ciclasa de *N.crassa* después de tratar el medio del clon 90 con suero de ratón, conteniendo o no suero de conejo anti-ratón. 100  $\mu$ l de medio fueron tratados con 50  $\mu$ l de suero ratón diluido 1:5 (V/V) en TBS-BSA, más 100 $\mu$ l de TBS-BSA, conteniendo o no, 14  $\mu$ g/ml de suero de conejo anti-ratón (Cappel). Las mezclas se mantuvieron por 18 hs a 4°C. Se centrifugaron y a 50  $\mu$ l de sobrenadante (equivalente a 20  $\mu$ l del medio original) se determinó el efecto inhibitorio sobre la adenil ciclasa.

colan.

En la figura 45 se muestra el perfil de elución de la columna. En forma paralela se purificó medio control. El gráfico muestra que el pico de absorvancia a 280 nm correspondiente a la inmunoglobulina monoclonal coincide con el pico de mayor inhibición. Esas fracciones se utilizaron para determinar dependencia de concentración y tiempo. El comportamiento de anticuerpo se demuestra en los gráficos de la figura 46 en la cual se ve que con concentraciones mínimas de anticuerpo purificado se logra un 80% de inhibición de la actividad de adenil ciclasa. El experimento que utilizó un medio control no indicó la presencia de una inmunoglobulina con actividad inhibitoria.

FUENTE BIOLOGICA	PREPARACION	ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA (pmoles/min/mg.prot.)		INHIBICION (%)
		Medio Control	Medio Clon 90	
Eritrocito de pavo (Membranas)	Fantasmas	29,0	29,3	-
Testículo de rata (soluble)	Extracto crudo	7,2	8,3	-
	DEAE-celulosa	32,0	33,0	-
	Bio-Gel	235,0	236,0	-
Trypanosoma cruzi (Membranas)	Sedimento de 105.000 xg	815,0	423,0	52
Mucor rouxii	Extracto crudo	47,1	37,0	22
Neurospora crassa (soluble)	Bio-Gel	536,0	97,0	82
Neurospora crassa (Membranas)	Sedimento de 105.000 xg	36,0	25,0	30

Tabla XVI. Efecto del medio de cultivo del clon 90 sobre la actividad de adenil ciclase de una variedad de fuentes y preparaciones. 20  $\mu$ l de cada preparación enzimática se preincubaron con 30  $\mu$ l de medio, durante 180 minutos a 22°C. Posteriormente en la mezcla se determinó la actividad enzimática.

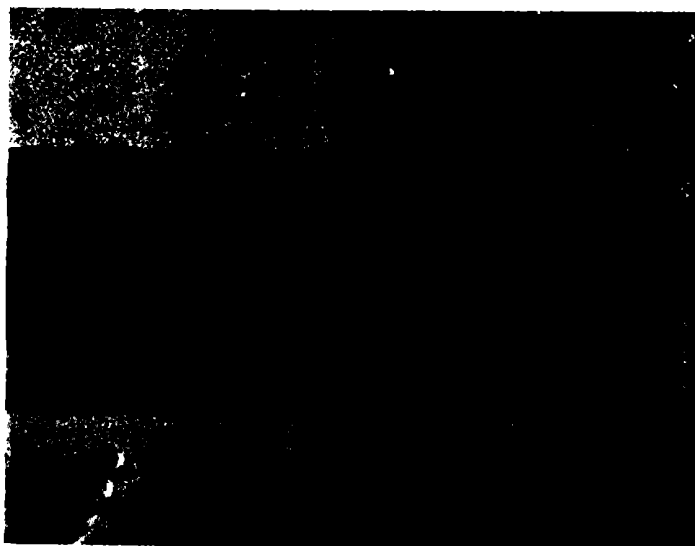


Figura 44. Inmunolectroforesis en soporte de agarosa.

VII-1. Discusión

En este apartado se muestran evidencias respecto de la obtención por primera vez de anticuerpos monoclonales para la adenil ciclasa de N. crassa. Por los experimentos aquí desarrollados, se puede inferir que el anticuerpo secretado por el clon 90 reconoce el sitio activo, o al menos reacciona contra algún epítopo que de alguna manera está relacionado con la actividad de la enzima, ya sea manteniendo una conformación

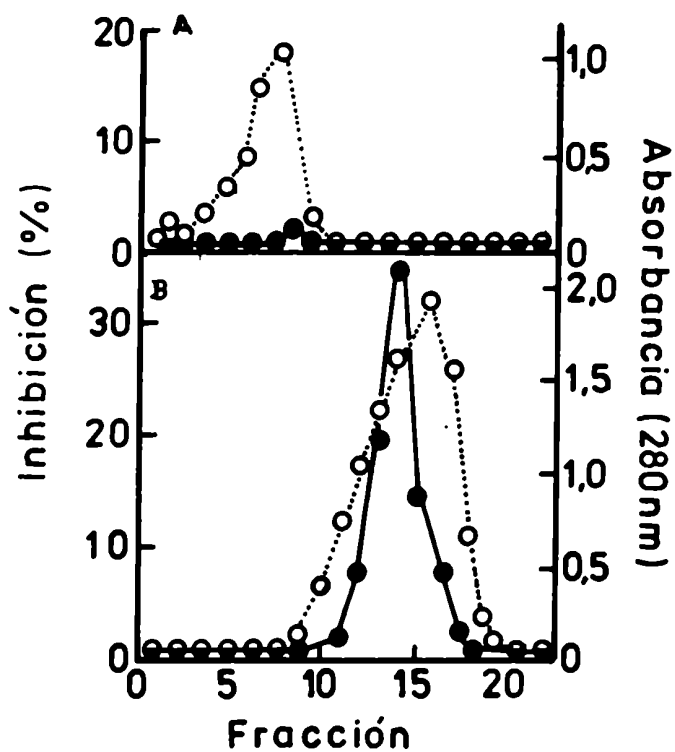


Figura 45. Perfil de elución de una cromatografía en DEAE-celulosa de un medio condicionado por hibridoma control (A) y de medio del clon 90 (B).



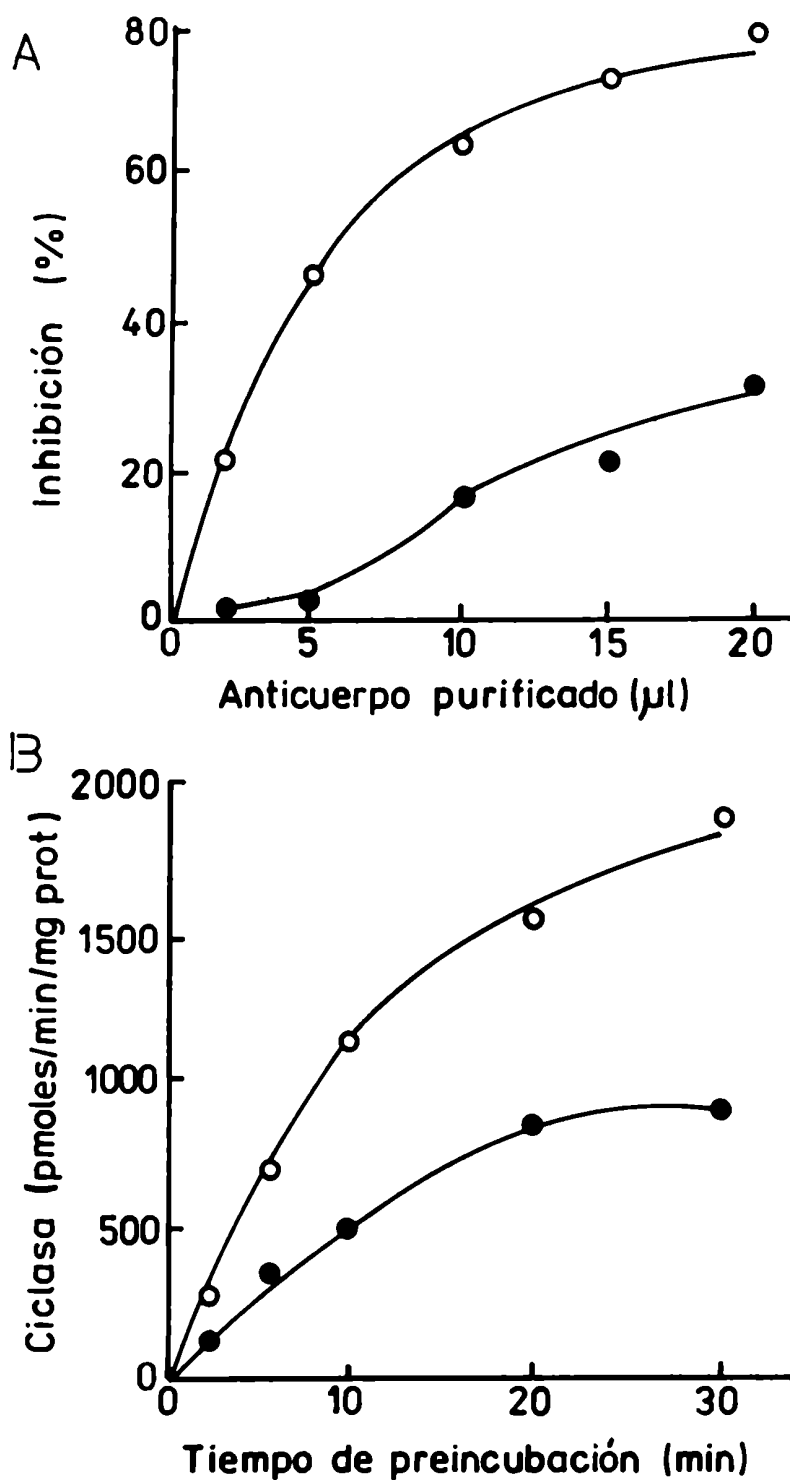


Figura 46. Variación de la inhibición de la actividad de adenil ciclasa de *N.crassa* por el anticuerpo del clon 90 en función de cantidad de anticuerpo presente en el ensayo (A) y en función del tiempo de preincubación de la mezcla (B). Las condiciones del ensayo son las indicadas en el texto de la figura 43.

estérica determinada o brindándole una afinidad o accesibilidad la sustrato respecto de dicho sitio.

En este momento el clon 90 está siendo amplificado, para luego ser propagado en animales de experimentación, para asegurar así una gran cantidad de anticuerpo (figura 15).

Este anticuerpo reconoce en forma variable las adenil ciclasas de organismos eucariotes inferiores, pero no la enzima de testículo o eritrocito de pavo. Este reconocimiento tampoco se hace utilizando un segundo anticuerpo precipitante. Esto significa que el determinante antigénico de eucariotes inferiores no se encuentra en las dos enzimas de eucariotes superiores estudiadas.

#### VIII. Anticuerpos monoclonales para la adenil ciclasa de T.cruzi

La obtención de anticuerpos monoclonales para la adenil ciclasa de T.cruzi se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para N.crassa.

Como se muestra en la tabla XVII, luego de haber determinado que los híbridos estaban secretando inmunoglobulinas, se ensayó la existencia de un efecto inhibitorio de los medios sobre la enzima. Se obtuvieron diferentes porcentajes de inhibición variando entre 20 y 50% de la actividad basal, pero hubo medios que ejercieron mayor efecto, por ejemplo los clones 11, 36 y 46 dieron un 55, 70 y 65% de inhibición, respectivamente.

Ante estos resultados se seleccionó el clon 36 para ser reclonado por dilución límite. El medio proveniente de este clon provocó una inhibición que fue proporcional a la cantidad del mismo agregado a la mezcla de incubación y también al tiempo de preincubación como se muestra en la figura 47.

MEDIO	VOLUMEN ( $\mu$ l)	TIEMPO DE PREINCUBACION (min)	ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA (pmol/min/mg.prot.)	INHIBICION (%)
Clon 11	20	180	366	55
Clon 23	20	180	489	40
Clon 36	20	180	244	70
Clon 46	20	180	285	65
Clon 81	20	180	416	49
Clon 5	20	180	685	6
Clon 16	20	180	652	20
Clon 30	20	180	611	25
Clon 50	20	180	611	25
Clon 73	20	180	530	35
Control	20	180	717	12
Nada	-	180	815	-

Tabla XVII. Inhibición producida por diferentes clones sobre la actividad de de adenil ciclasa de N.crassa. Las condiciones del ensayo son las indicadas en el texto.

Además, el efecto inhibitorio se bloqueó al tratar el medio con suero de conejo anti-ratón, indicando de esta forma que el efecto inhibitorio se debe a la presencia de una inmunoglobulina (tabla XVIII).

Estos datos permiten inferir que se obtuvo un anticuerpo que ejerce una acción inhibitoria sobre la adenil ciclasa de T.cruzi. A través de inmunolectroforesis y por reacción inmunoenzimática con los anticuerpos específicos, se logro determinar que se trata de una inmunoglobulina de tipo G2b, los detalles experimentales se desarrollaron en los apartados XVII-5 y XVII-8 de "Materiales y Métodos".

Al igual que se hizo con el anticuerpo para la adenil ciclasa de N.crassa, se probó si este anticuerpo derivado del clon 36 tenfa algún efecto sobre adenil ciclasas de otros orígenes, tanto solubles como asociados a membranas. En la tabla XIX se pueden observar los resultados obtenidos. Se encontraron diferentes grados de inhibición en enzimas provenientes de organismos eucariotes inferiores, pero no con enzimas de origen bacteriano como E.coli ni con organismos eucariotes superiores. Es decir que existe un cierto grado de homología en las subunidades catalíticas de las enzimas provenientes de eucariotes inferiores.

Una vez obtenida una cantidad suficiente de medio del clon 36, se procedió a su purificación tal como se especificó en el apartado XVII-7 de "Materiales y Métodos". Luego de la precipitación con  $(NH_4)_2SO_4$ , se realizó una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa. En la figura 48 se puede ver el perfil de elución de la columna.

Con el anticuerpo purificado se trató de comprobar si seguía manteniendo las características, en cuanto a comportamiento en función del tiempo de preincubación y concentración del mismo en el medio de reacción. En la figura 49 se muestra que las propiedades previamente establecidas en medios de cultivo se mantienen.

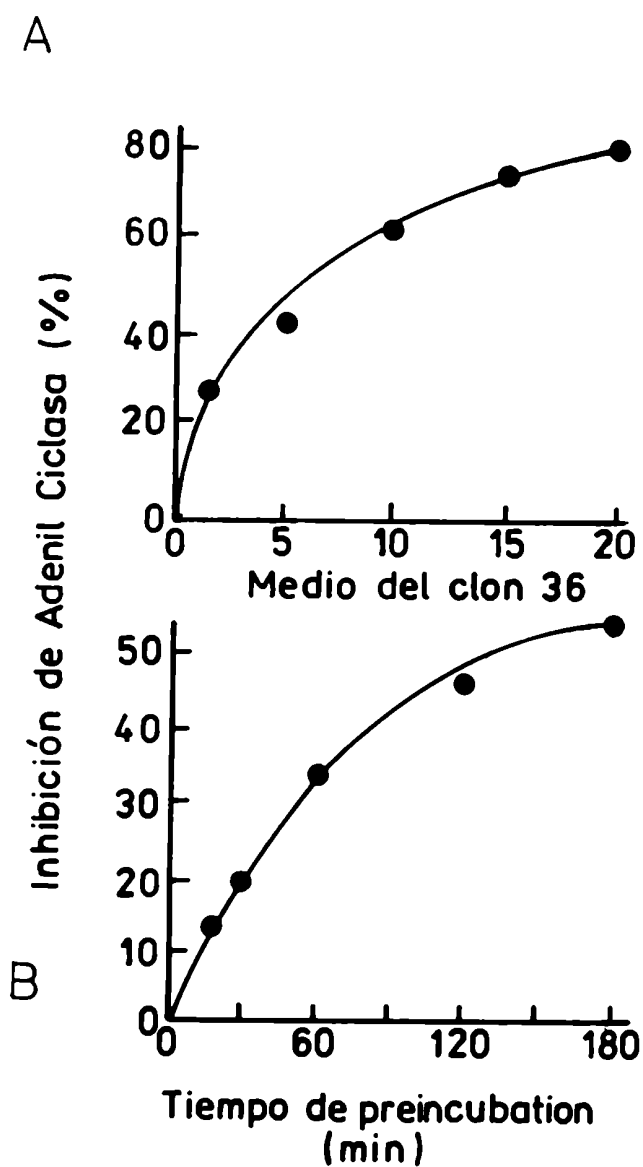


Figura 47. Variación de la inhibición de la actividad de adenil ciclasa de *T. cruzi* con el aumento de la cantidad de medio del clon 36 presente en el ensayo (A) y en función del tiempo de preincubación de la mezcla (B). 20 µl de preparación enzimática se preincubaban con cantidades variables de medio durante 180 minutos a 22°C (A) o 20 µl de la preparación enzimática se preincubaban con 30 µl de medio durante tiempos variables a 22°C (B). Posteriormente en la mezcla se determinó la actividad enzimática.

Medio	Volumen ( $\mu$ l)	Tiempo de preincubación (min)	Actividad de adenil ciclasa pmol/min/mg.prot.	Inhibición (%)
Control	20	180	420	-
Clon 36 (tratado con suero de conejo anti-ratón)	equivale 20	180	415	-
Clon 36 (tratado con suero normal de ratón)	equivale 20	180	80	81

Tabla XVIII. Inhibición de la actividad de adenil ciclasa de T.cruzi después de tratar el medio del clon 36 con suero de ratón conteniendo o no suero de conejo anti-ratón. Las condiciones se especifican en el texto de la tabla XV.

Una vez confirmada la actividad inmunológica del anticuerpo se lo acopló a Sefarosa-4B, previamente activada con BrCN (apartado V de "Materiales y Métodos").

VIII-1. Purificación de la adenil ciclasa de T.cruzi por inmu-noafinidad.

La preparación denominada Hexilamino-sefarosa fue sembrada y reciclada por una columna de anticuerpo-sefarosa. Luego de un exhaustivo lavado fue eluida por un incremento del pH. La figura 50 muestra el perfil de la columna.

Como puede verse en la tabla XX, el último paso de purificación permitió obtener una preparación de adenil ciclasa cuya actividad específica fue 263 veces mayor que la original presente en el S<sub>105</sub>. En forma paralela, como control y en igualdad de condiciones, se cromatografió la preparación de

FUENTE BIOLÓGICA	PREPARACION	ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA (pmoles/min/mg.prot.)		INHIBICION (%)
		Medio Control	Medio Clon 36	
T.cruzi (Membranas)	pptado. 105.000 x g	420	80	81
N.crassa (soluble)	Hexilamino- sefarosa	200	96	51
N.crassa (Membranas)	pptado. 105.000 x g	32	24	25
Mucor rouxii	Extracto crudo	45	36	20
E. coli	Extracto crudo	120	117	2
Testículo de rata (soluble)	Sobrenadante 105.000 x g	8	9	-
Hígado de rata (Membranas)	Purificadas	200	195	2
Eritrocito de pavo (Membranas)	Fantasmas	25	25	-

Tabla XIX. Efecto del medio de cultivo del clon 36 sobre la actividad de adenil ciclase en una variedad de fuentes y preparaciones. Las condiciones se especifican en el texto de la tabla XVI.

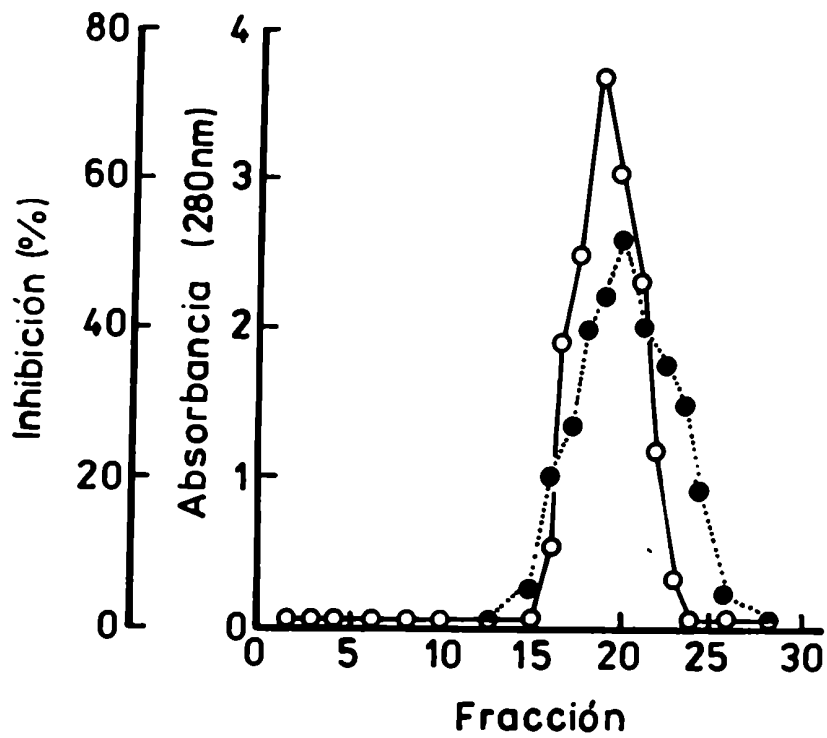


Figura 48. Perfil de elución de una cromatografía en DEAE-celulosa de medio condicionado por hibridomas del clon 36. (○), actividad de adenil ciclasa; (●), proteína.



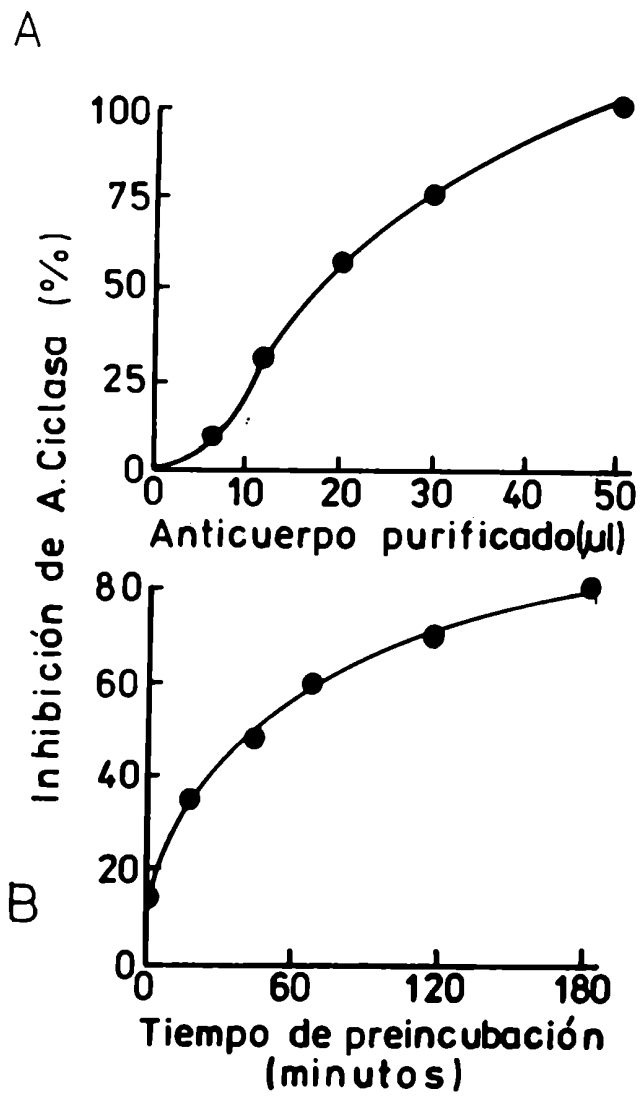


Figura 49. Variación de la inhibición de la actividad de la adenil ciclasa de *T. cruzi* por el anticuerpo del clon 36 purificado en función de la cantidad de anticuerpo presente en el ensayo (A) y en función del tiempo de preincubación de la mezcla (B). Las condiciones del ensayo son las indicadas en el texto de la figura 43.

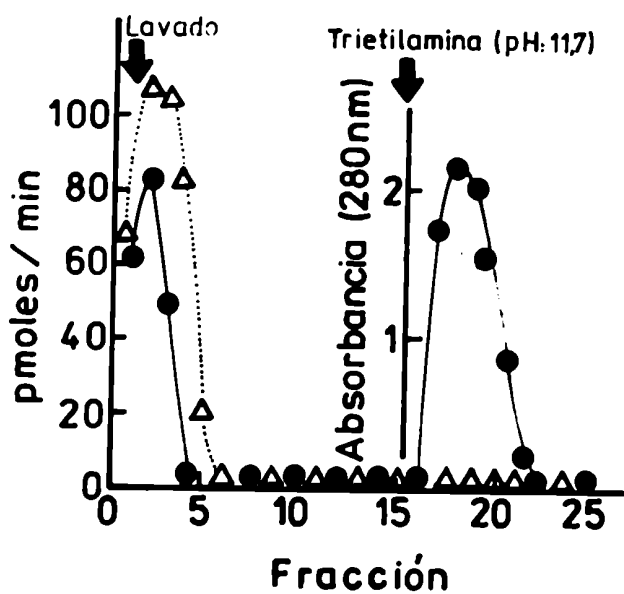


Figura 50. Perfil de elución de la adenil ciclasa de *T.cruzi* en una columna cromatográfica de anticuerpo-sefarosa. Las condiciones se detallan en el apartado (●), actividad de adenil ciclasa; (Δ), proteína.

hexilamino-sefarosa, en una columna cuya matriz fue sólo sefarosa. En base a los datos obtenidos, se calculó un factor de inactivación de la enzima de 8,4 veces. De tal modo, haciendo la corrección adecuada se tiene una purificación de 2.216 veces.

#### VIII-2. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida.

En la figura 51, se muestra un gel analítico en SDS-poliacrilamida, teñido con  $\text{AgNO}_3$ , correspondiente a la fracción obtenida después de la cromatografía en anticuerpo-sefarosa. Puede apreciarse una banda mayoritaria, correspondiente a un peso molecular de 50.000D y otras dos de 45.000D y 40.000D, cuya intensidad fue menor. Para confirmar la posibilidad de que el polipéptido de mayor peso molecular estuviese asociado a la actividad antigénica de la adenil ciclasa, se realizó una transferencia de dichas proteínas a papel de nitrocelulosa y posteriormente se las detectó inmunológicamente utilizando el anticuerpo monoclonal, según se describe a continuación.

#### VIII-3. Electrotransferencia de adenil ciclasa e inmunoprecipitación "in situ" con anticuerpos específicos.

Una muestra similar a la que se tiñó con  $\text{AgNO}_3$ , se transfirió a papel de nitrocelulosa y en él se desarrolló la técnica de inmunoperoxidasa, tal como se especifica en el apartado XVII-9 de "Materiales y Métodos". Aparece una banda de inmunoprecipitación específica que coincide con un peso molecular de 55.000D. En la figura 52 se puede observar tal resultado.

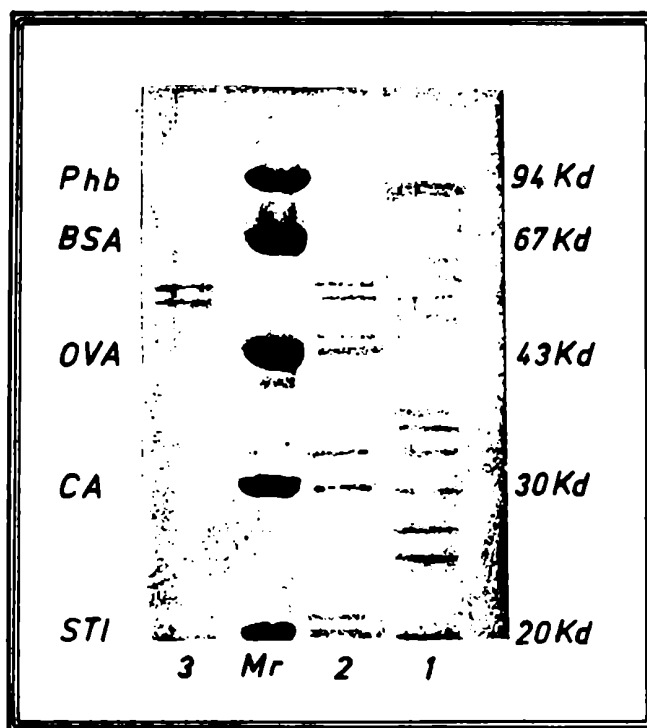
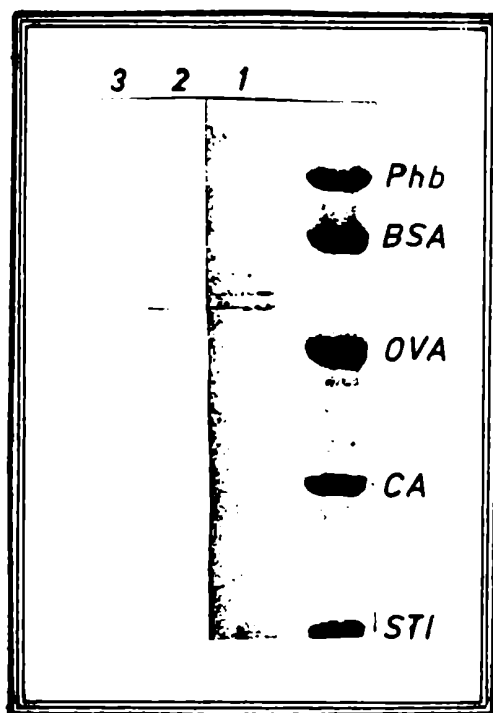


Figura 51. Electroforesis analítica en gel de SDS-poliacrilamida (10% P/V)  
1. Extracto crudo; 2. Fracción hexilamino-sefarosa; 3. Fracción anticuerpo-sefarosa; Mr. Proteínas marcadoras.  
Phb= Fosforilasa b; BSA= Seroalbúmina bovina; OVA= Ovoalbúmina; CA= Anhidrasa carbónica; STI= Inhibidor de tripsina de soja.



- 1) Eluido de la columna anticuerpo-sefarosa
- 2) Transferencia e inmuno-precipitación "in situ"
- 3) Control

Figura 52. Electrotransferencia de la adenil ciclasa de *T.cruzi* e inmuno-precipitación "in situ" con el anticuerpo monoclonal correspondiente. Abreviaturas, ver Figura 51.

Fracción	Proteína (mg)	Actividad de adenil ciclasa		Recuperación (%)	Purificación (veces)
		Total (pmol/min)	Específica (pmol/min/mg)		
S <sub>105</sub>	140	9.830	70,21	100	1,0
Hexilamino- sefarosa	21	5.891	280,52	60	4,0
Anticuerpo sefarosa	0,01	185	18.500	1,88	263,8

Tabla XX. Purificación de la adenil ciclasa de T. cruzi.  
Los datos corresponden a la fracción S<sub>105</sub>, preparada a partir de un extracto solubilizado de 5 gr. de epimastigotes.

Las evidencias presentadas permiten inferir que la banda de 55.000D observada en los geles de poliacrilamida de la preparación de adenil ciclasa, es la portadora de la actividad antigénica de la enzima y estaría asociada con la actividad de la misma.

#### VIII-4. Discusión.

En el presente apartado se describió la obtención de anticuerpos monoclonales contra la adenil ciclasa de T. cruzi, que junto con los obtenidos contra la enzima de N. crassa son los primeros producidos para este tipo de proteínas.

Dentro de las enzimas implicadas en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, se ha descrito la obtención de

anticuerpos monoclonales para la guanil ciclasa (248) y la fosfodiesterasa (249). En ninguno de los dos casos el anticuerpo parece reconocer el sitio activo. En esta tesis se desarrolla la obtención de anticuerpos monoclonales para las adenil ciclasas de T.cruzi y N.crassa que alteran la actividad enzimática. Dichos anticuerpos podrían reconocer epitopes pertenecientes al sitio activo o no. Esta última posibilidad no se puede descartar, ya que el determinante antigénico se puede situar en un lugar, que al unirse a él, provoque un cambio conformacional que altere la actividad enzimática.

Al igual que el clon 90, el clon 36 está siendo amplificado para poder ser inyectado en ratón (figura 15).

El reconocimiento, por parte del anticuerpo, del determinante antigénico en menor o mayor grado en la enzima de diferentes eucariotes inferiores sugieren la existencia de cierta semejanza, ya sea en la secuenciación de aminoácidos o de conformación estructural entre los mismos.

El hecho de que estos anticuerpos no interactúen con la enzima de organismos superiores, no permite concluir que las moléculas proteicas sean realmente muy distintas. El anticuerpo monoclonal posee una característica muy particular, la especificidad. De manera tal que, el reconocimiento se realiza en un "locus" determinado de la molécula, que puede ser reconocido o no y ser más o menos accesible a la unión debido a su ubicación en el dominio total de la molécula.

El anticuerpo monoclonal producido tiene importantes aplicaciones en el estudio de la adenil ciclasa. Entre las ventajas que podrían destacarse en cuanto a su utilización, pueden señalarse las siguientes:

1. Permitir la purificación por inmunoafinidad de estas y otras enzimas a las cuales reconozca.

2. Utilizar el anticuerpo en la detección "in vivo" de la ubicación de la enzima.
3. Permitir la caracterización de dominios moleculares determinados, reconocidos por el anticuerpo.
4. Aislar el RNA mensajero que codifica para la enzima, mediante la precipitación de polisomas donde se está sintetizando la misma.

En este trabajo se describe por primera vez, la purificación parcial de 2.200 veces de una adenil ciclasa asociada a membranas mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal.

El motivo por el cual es difícil de lograr una purificación razonable se debe atribuir a lo siguiente:

1. En casi todos los tejidos la ciclasa es una enzima de membrana y su purificación requiere que los procedimientos de fraccionamiento sean llevados a cabo en presencia de detergentes.
2. La actividad enzimática es extremadamente lábil. "In vitro" y a temperatura ambiente presenta una vida media de minutos.
3. La enzima probablemente represente menos de un 0,005% de la proteína total de la membrana.

Existen en la literatura científica muy pocos trabajos con resultados exitosos en lo que respecta a purificación de adenil ciclasa. Quizás los únicos trabajos completos hasta el presente sean la purificación de las ciclasas "solubles" de Brevibacterium liquefaciens (250), testículo de rata (173) y Neurospora crassa (236).

Las evidencias presentadas en los apartados VII-2 y VII-3 de esta sección, muestran una correlación satisfactoria



que indicaría que un polipéptido con un peso molecular aparente de 55.000D podría formar parte de la estructura de la enzima. Según los cálculos realizados a partir de los parámetros hidrodinámicos, la adenil ciclasa de T. cruzi tendría un peso molecular de 130.000D, esto sugiere la posibilidad de que esta enzima sea una proteína dimérica.

C O N C L U S I O N E S

#### IV. CONCLUSIONES.

1. La adenil ciclasa de T. cruzi es una enzima fuertemente asociada a membrana, la cual se obtuvo en forma soluble, mediante la utilización en el tampón de extracción de detergente y alta fuerza iónica.
2. La enzima presenta un punto isoeléctrico de 6,2 unidades. Se calcularon los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la misma por medio de filtraciones en gel y ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa, realizadas en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O. Los resultados indicaron que tiene una coeficiencia de sedimentación en H<sub>2</sub>O de 6,25 y 5,05 en D<sub>2</sub>O, un radio de Stokes de 5,65 nm; un volumen específico parcial de 0,83 ml/g y un peso molecular relativo de 117.000D. Este último dato, junto con el calculado en geles de SDS-poliacrilamida de la enzima parcialmente purificada, sugieren para la misma una estructura dimérica, constituida por dos subunidades de 55.000D de peso molecular.
3. La adenil ciclasa de T. cruzi es capaz de interaccionar con componentes reguladores del sistema adenil ciclasa de membranas de hígado conformando un sistema con las mismas propiedades que el de organismos eucariotes superiores. Esto sugiere la existencia de similitud entre la ciclasa de Trypanosoma y la subunidad catalítica de eucariotes superiores.
4. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales para la adenil ciclasa de T. cruzi, capaces de inhibir la actividad enzimática.
5. El anticuerpo monoclonal reacciona con otras adenil ciclasas de eucariotes inferiores, pero no con enzima proveniente de vertebrados.

6. La enzima fue parcialmente purificada por inmunoafinidad y se logró obtener 2.200 veces más pura que el extracto del cual se partió

7. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales para la adenil ciclase de N. crassa, capaces de inhibir no sólo su actividad enzimática, sino también las de otros eucariotes inferiores. No ocurrió lo mismo con las adenil ciclasas de organismos eucariotes superiores.

8. Con la adenil ciclase de N. crassa se logró obtener un sistema sensible a hormonas, mediante la reconstitución con el componente regulatorio de eritrocito de pavo. Estos resultados sugieren que debe existir una estrecha relación entre la adenil ciclase de Neurospora y el componente catalítico del sistema adenil ciclase de organismos superiores.



Jones



Tomella

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA.

1. Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1960) Pharmac.Rev. 12: 265.
2. de Jonge, H.R. (1981) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 14: 315.
3. Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1957) J.Am.Chem.Soc. 79: 3608.
4. Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1958) J.Biol.Chem. 232: 1077.
5. Rall, T.W.; Sutherland, E.W. y Berthet, J. (1957) Biol.Chem. 224: 463.
6. Sutherland, E.W.; Rall, T.W. y Menon, T. (1962) J.Biol.Chem. 237: 1220.
7. Robinson, G.A.; Bütcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1971) Cyclic AMP. Academic Press, New York.
8. Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) J.Biol.Chem. 247: 6873.
9. Kornblihtt, A.R.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1981) Biochem. 20: 1262.
10. Torres, H.N. (1980) Endocrinología Molecular, Ed. El Ateneo. Cap.7, pp.75, Buenos Aires.
11. Greengard, O. (1969) Science 163: 891.
12. Weiss, B. (1970) Biogenic Amines as Physiological Regulators, J.J.Blum Ed., Prentice Hall, New Jersey.
13. Chlapowski, F.J. y Bütcher, R.W. (1973) Biochim.Biophys.Acta 309: 138.
14. Varimo, K. y Londesborough, J. (1976) Biochem.J. 159: 363.
15. Hirata, M. y Hayaishi, O. (1967) Biochim.Biophys.Acta 149: 1.
16. Tao, M. y Lipmann, F. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 63: 86.
17. Brown, E.G.; Al-Nafari, T. y Newton, R.P. (1979) Phytochemistry 18: 9.
18. Braun, T. y Dods, R.F. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 1097.
19. Davoren, P.R. y Sutherland, E.W. (1963) J.Biol.Chem. 238: 3016.
20. Pohl, S.L.; Birnbaumer, L. y Rodbell, M. (1969) Science 164: 566.
21. Neville, D.M.Jr. (1968) Biochim.Biophys.Acta 164: 540.

22. Hetcher,O.; Bar,H.P.; Matsuka,M. y Soifer,D. (1969) *Life Sciences* 8. Part.1: 935.
23. Soifer,D. y Hetcher,O. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* 230: 539.
24. Perkins,J.P. (1973) *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 3: 1.
25. Birnbaumer,L. (1977) *Receptor and Hormone Action*, vol.1, cap.16, New York, pp.485.
26. Stellwagen,E. y Baker,B. (1976) *Nature* 261: 719.
27. Robinson,G.A.; Bütcher,R.W. y Sutherland,E.W. (1967) *Ann.N.Y.Acad.Sci.*139: 703.
28. Birnbaumer,L.; Pohl,S.L.; Krans, H.M.J. y Rodbell,M. (1970) *Adv.Biochem. Psychopharmacol.* 3: 185.
29. Harden,T.K.; Wolfe,B.B.; Sporn,J.R.; Perkins,J.P. y Molinoff,P.B. (1977) *Brain Res.* 125: 99.
30. Harden,T.K.: Foster,S.J. y Perkins,J.P. (1979) *J.Biol.Chem.* 254: 4416
31. Schramm,M. y Naim,E. (1970) *J.Biol.Chem.* 245: 3225.
32. Schramm,M. (1976) *J.Cyclic Nucleotide Res.* 2: 347.
33. Insel,P.A.; Maguire,M.E.; Gilman,A.G.; Bourne,H.R.; Coffino,P. y Melmon, K.L. (1976) *Mol.Pharmacol.* 12: 1062.
34. Limbird,L.E. y Lefkowitz,R.J. (1977) *J.Biol.Chem.* 252: 799.
35. Haga,T.; Haga,K. y Gilman,A.G. (1977) *J.Biol.Chem.* 252: 5776.
36. Hetcher,O. (1965) *Machanisms of Hormone Action*,Ed. Karlson P., Academic Press, New York.
37. Pfeuffer,T. y Helmreich,E.J.M. (1975) *J.Biol.Chem.* 250: 867.
38. Pfeuffer,T. (1977) *J.Biol.Chem.* 252: 7224.
39. Johnson,G.L.; Kaslow,H.R.; Farfel,Z. y Bourne,H.R. (1980) *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 13: 1.
40. Ross,E.M.; Howlett,A.C.; Ferguson,K.M. y Gilman,A.G. (1978) *J.Biol.Chem.* 253: 6401.
41. Ross,E.M. y Gilman,A.G. (1977) *J.Biol.Chem.* 252: 6966.

42. Ross, E.M. (1981) J.Biol.Chem. 256: 1949.
43. Neer, E.J. (1978) J.Biol.Chem. 253: 5808.
44. Howler, A.C.; Sternweis, P.C.; Macik, B.A.; Van Arsdale, P.M. y Gilman, A.G. (1979) J.Biol.Chem. 254: 2287.
45. Sternweis, P.C.; Northrup, J.K.; Smigel, M.D. y Gilman, A.G. (1981) J.Biol. Chem. 256: 11526.
46. Moss, J. y Vaughan, M. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48: 581.
47. Cassel, D. y Selinger, Z. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74: 3307.
48. Johnson, G.L.; Kaslow, H.R. y Bourne, H.R. (1978) J.Biol.Chem. 253: 7120.
49. Northrup, J.K.; Sternweis, P.C.; Smigel, M.D.; Schleifer, L.S.; Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77: 6516.
50. Rodbel, M. (1980) Nature 284: 17.
51. Northrup, J.K.; Smigel, M.D. y Gilman, A.G. (1982) J.Biol.Chem. 257: 11416.
52. Hildebrandt, J.D.; Sekura, R.D.; Codina, J.; Iyengar, R.; Manclark, C.R. y Birnbaumer, L. (1983) Nature 302: 706.
53. Bobock, G.M.; Katada, T.; Northrup, J.K.; Hewlett, E.L. y Gilman, A.G. (1983) J.Biol.Chem. 258: 2072.
54. Lands, A.M.; Arnold, A.; McAuliff, J.P.; Luduena, F.P. y Brown, T.C. (1967) Nature 214: 597.
55. Berthelson, F. y Pettinger, W.A. (1977) Life Sci. 21: 595.
56. Jacobs, K.H. (1979) Mol.Cell.Endocrinol. 16: 147.
57. Lefkowitz, R.J.; Stadel, J.M. y Caron, M.G. (1983) Ann.Rev.Biochem. 52: 159.
58. Cryer, P.E.; Jarret, L. y Kipnis, D.M. (1969) Biochim.Biophys.Acta 117: 586.
59. Harwood, J.P.; Low, H. y Rodbell, M. (1973) J.Biol.Chem. 248: 6239.
60. Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S.L. y Krans, H.M.J. (1971) J.Biol.Chem. 246: 1877.
61. Maguire, M.E.; Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1977) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 8: 1.
62. Jakobs, K.H.; Aktories, K. y Schultz, G. (1981) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 14: 173.



63. Rodbell, M.; Krans, H.M.J.; Pohl, S.L. y Birnbaumer, L. (1971) J.Biol.Chem. 246: 1872.
64. Lad, P.M.; Preston, M.S.; Welton, A.F.; Nielsen, T.B. y Rodbell, M. (1979) Biochim.Biophys.Acta 551: 368.
65. Lefkowitz, R.J.; Mullikin, D.; Wood, C.L.; Gore, T.B. y Mukherjee, C. (1977) J.Biol.Chem. 252: 5295.
66. Williams, L.T. y Lefkowitz, R.J. (1977) J.Biol.Chem. 252: 7207.
67. Maguire, M.E.; Van Arsdale, P.M. y Gilman, A.C. (1976) Mol.Pharmacol. 12: 335.
68. Lefkowitz, R.J.; Mullikin, D. y Caron, M.G. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4686.
69. Spiegel, A.M.; Brown, E.M.; Fedak, S.A.; Woodard, C.J. y Aurbach, G.D. (1976) J.Cyclic Nucleotide Res. 2: 47.
70. Bennet, V. y Cuatrecasas, P. (1976) J.Membr.Biol. 27: 207.
71. Cassel, D. y Selinger, Z. (1976) Biochim.Biophys.Acta 452: 538.
72. Selinger, Z. y Cassel, D. (1981) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 14: 15.
73. Gill, D.M. (1977) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 8: 85.
74. Sharp, G.W.G. y Hynie, S. (1971) Nature 229: 256.
75. Pierce, N.F.; Greenough, W.B. y Carpenter, C.C.J.Jr. (1971) Bacteriol.Rev. 35: 1.
76. Bilezikian, J.P.; Spiegel, A.M.; Brown, E.M. y Aurbach, G.D. (1977) Mol. Pharmacol. 13: 775.
77. Cuatrecasas, P. (1973) Biochemistry 12: 3547.
78. Peterson, J.W.; Lospatullo, J.J. y Finkelsstein, R.A. (1972) J.Inf.Dis. 129: 617.
79. Gill, D.M. y King, C.A. (1975) J.Biol.Chem. 250: 6424.
80. Gill, D.M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 2064.
81. Martin, B.R.; Houslay, M.D. y Kennedy, E.L. (1977) Biochem.J. 161: 639.
82. Hazeki, O. y Ui, M. (1981) J.Biol.Chem. 256: 2856.
83. Katada, T. y Ui, M. (1981) J.Biol.Chem. 256: 8310.

84. Katada,T. y Ui,M. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 79: 3129.
85. Katada,T. y Ui,M. (1982) J.Biol.Chem. 257: 7210.
86. Murayama,T. y Ui,M. (1983) J.Biol.Chem. 258: 3319.
87. Bokoch,G.M.; Katada,T.; Northrup,J.K.; Jewlett,E.L. y Gilman,A.G. (1983) J.Biol.Chem. 258: 2072.
88. Codina,J.; Hildebrandt,J.; Iyengar,R.; Birnbaumer,L.; Sekura,R. y Manclerk,C.R. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 80: 4276.
89. Drummond,G.I. y Duncan,L. (1970) J.Biol.Chem. 245: 976.
90. Perkins,J. y Moore,M. (1971) J.Biol.Chem. 246: 62.
91. Neer,E.J. (1973) J.Biol.Chem. 248: 3742.
92. Birnbaumer,L. y Rodbell,M. (1969) J.Biol.Chem. 244: 2477.
93. Birnbaumer,L. (1977) "Receptors and Hormone Action" Cap.16: 485. Acad. Press.
94. Harwood,J. y Rodbell,M. (1973) J.Biol.Chem. 248: 4901.
95. Manganiello,V.C. y Vaughan,M. (1976) J.Biol.Chem. 251: 6205.
96. Metzger,H. y Linder,E. (1981) Arzneim.Forsch. 31: 1248.
97. Seamon,K.; Padgett,W. y Daly,J.W. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 28: 3363.
98. Seamon,K. y Daly,J. (1983) T.I.P.S. 3: 120.
99. Means,A.R. y Dedman,J.R. (1980) Nature 285: 73.
100. Meyer,W.L.; Fischer,W.H. y Krebs,E.G. (1964) Biochem. 3: 1033.
101. Cheung,W.Y. (1970) Biochem.Biophys.Res.Commun 38: 533.
102. Kakiuchi,S. y Yamazaki,R. (1970) Biochem.Biophys.Res.Commun 41: 1104.
103. Cheung,W.Y. (1980) Science 207: 19.
104. Lin,Y.M.; Liu,Y.P. y Cheung,W.Y. (1974) J.Biol.Chem. 249: 4943.
105. Liu,Y.P. y Cheung,W.Y. (1976) J.Biol.Chem. 251: 4193.
106. Sharma,R.K.; Wang,T.H.; Wirch,E. y Wang,J.H. (1980) J.Biol.Chem. 255: 5916.

107. Broston,C.O.; Huang,Y.C.; Breckenridge,B.M. y Wolff,D.J. (1975) Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 64.
108. Cheung,W.Y.; Bradham,L.S.; Lynch,T.J.; Lin,Y.M. y Tallant,E.A. (1975) Biochem.Biophys.Res.Comm. 66: 5677.
109. Cheung,W.Y. (1980) "Calcium and Cell Function" vol.I: 109. Academic Press.
110. Toscano,W.A.; Westcott,K.R.; La Porte,D.C. y Storm,D.R. (1979) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 76: 5582.
111. Salter,R.S.; Krinks,M.H.; Klee,C.K. y Neer,E.J. (1981) J.Biol.Chem. 256: 9830.
112. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1973) F.E.B.S. Lett. 30: 74.
113. Schimmer,B.P.; Veda,K. y Sato,G.H. (1968) Biochem.Biophys.Res.Comm. 32: 806.
114. Rodbell,M.; Birnbaumer,L. y Pohl,S.L. (1970) J.Biol.Chem. 245: 718.
115. Birnbaumer,L. y Rodbell,M. (1969) J.Biol.Chem. 244: 2477.
116. Rodbell,M.; Birnbaumer,L.; Pohl,S.L. y Sundby,F. (1971) Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 68: 909.
117. Fain,J.N. y Butcher,F.R. "Cyclic Nucleotides in Mode of Hormone Action" en Endocrine Physiology, Ed.S.M.McCann and A.C. Guyton, pp.241 (1977). University Park Press.
118. Birnbaumer,L.; Pohl,S.L.; Rodbell,M. y Sundby,F. (1972) J.Biol.Chem. 247: 2038.
119. Kauman,A.J. y Birnbaumer,L. (1974) J.Biol.Chem. 249: 7874.
120. Murad,F.; Schi,Y.M.; Rall,T.W. y Sutherland,E.W. (1962) J.Biol.Chem. 237: 1233.
121. Aktories,K.; Schultz,G. y Jakobs,K.H. (1979) F.E.B.S. Lett. 107: 100
122. Bockaert,J. y Sebben-Perez,M. (1983) F.E.B.S. Lett. 161: 113.
123. Londos,C. y Wolff,J. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74: 5482.
124. Wolff,J.; Londos,C. y Cooper,D.M.F. (1981) Adv.Cyclic Nucleotide Res. 14: 199.
125. Bennett,U.; O'Keefe,E. y Cuatrecasas,P. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 33.

126. Singer, S.J. y Nicholson, G.L. (1972) Science 175: 720.
127. Orly, J. y Schramm, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 4410.
128. Schlöster, D.; Orly, J.; Seidel, G. y Schramm, M. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1201.
129. Bitensky, M.W. y Gorman, R.E. (1973) Prog. Biophys. Mol. Prior. 26: 409.
130. Hers, H.G. (1976) Ann. Rev. Biochem.: 167.
131. Walsh, D.A.; Perkins, J.P. y Krebs, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3763.
132. Rodnight, R. y Lanvin, B.E. (1964) Biochem. J. 93: 84.
133. Kuo, J.F. y Greengard, P. (1970) J. Biol. Chem. 245: 2493.
134. Waisman, D.M.; Singh, T.J. y Wang, J.H. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3387.
135. Lebleu, B.G.; Sen, G.C.; Shaila, B.; Cabrer, B. y Lengyel, P. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 3107.
136. Wong, T.W., Goldberg, A.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2529.
137. Beavo, J.A.; Betchel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 241.
138. Rosen, O.M.; Erlichman, J. y Rubin, C.S. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 253.
139. Corbin, J.D. y Keely, S.L. (1977) J. Biol. Chem. 252: 910.
140. Erlichman, J.; Rosenfeld, R. y Rosen, O.M. (1974) J. Biol. Chem. 249: 5000.
141. Hofman, F.; Beavo, J.A.; Betchel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250: 7795.
142. Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M. (1976) J. Biol. Chem. 251: 3376.
143. Hoppe, J.; Matutzky, R. y Shaltiel, S. (1975) Eur. J. Biochem. 90: 427.
144. Li, H.C.; Hsiao, K.J. y Chan, W.W.S. (1978) Eur. J. Biochem. 84: 215.
145. Krebs, E.G. y Beavo, J.A. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 923.
146. Huang, F.L. y Glinsman, W.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3004.
147. Nimmo, G.A. y Cohen, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87: 353.
148. Ide, M.; Yoshimoto, A. y Okabayashi, T. (1967) J. Bacteriol. 94: 317.

149. Takai, K.; Kurashina, Y.; Suzuki-Hori, C.; Okamoto, H. y Hayaishi, O. (1974) J. Biol. Chem. 249: 1965.
150. Ide, M. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 144: 262.
151. Jost, J.P. y Rickenberg, H.V. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40: 741.
152. Tomkins, G.M. (1975) Science 189: 760.
153. Pall, M.L.; Trevillyan, J.M. y Hinman, N. (1981) Molec. Cell Biol. 1: 1.
154. Matsumoto, K.; Uno, I.; Toh-e, A.; Ishikawa, T. y Oshima, Y. (1982) J. Bacteriol. 151: 277.
155. Dunlap, K. (1977) J. Physiol. 271: 119.
156. Eckert, R. y Brehm, P. (1979) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8: 353.
157. Schultz, J.E. y Klumpp, S. (1982) F.E.M.S. Microbiol. Lett. 13: 303.
158. Lewis, R.M. y Nelson, D.L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 615: 341.
159. Schultz, J.E. y Klumpp, S. (1983) F.E.B.S. Lett. 154: 347.
160. Kassis, S. y Kindler, S.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 391: 513.
161. Voichick, J.; Elson, G.; Granner, D. y Shrago, E. (1973) J. Bacteriol. 115: 58.
162. Larsen, A.F. y Sypherd, P.S. (1974) J. Bacteriol. 117: 432.
163. Paveto, C.; Epstein, A. y Passeron, S. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 169: 449.
164. Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 219: 1.
165. Van Wijk, R. y Konijn, T.M. (1971) F.E.B.S. Lett. 13: 184.
- 166.. Mahler, H.R. y Lin, C.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83: 1039.
167. Sy, J. y Ritcher, D. (1972) Biochem. 11: 2788.
168. Casperon, G.F.; Walfer, N.; Brasier, A.R. y Bourne, H.R. (1983) J. Biol. Chem. 258: 7911.
169. Lovett, J.S. (1975) Bacteriol. Rev. 39: 345.
170. Gomez, S.L.; Mennucci, L. y Maia, J.C.C. (1978) Biochim. Biophys. Acta. 541: 190.

171. Seale, T. (1973) J. Bacteriol. 113: 1015.
172. Metzberg, R.L. (1979) Microbiol. Rev. 43: 361.
173. Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6880.
174. Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) Biochim. Biophys. Acta 289: 428.
175. Kornblihtt, A. (1980) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
176. Reig Macia, J.A.; Kornblihtt, A.R.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1982) Biochem. J. 207: 43.
177. Glod, M.H. y Sebel, I.H. (1974) J. Biol. Chem. 249: 2417.
178. Judewicz, N.D.; Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 206: 87.
179. Glikin, G.C.; Judewicz, N.D. y Torres, H.N. (1982) Mol. Cell. Biochem. 46: 121.
180. Scott, W.A. y Solomon, B. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53: 1024.
181. Téllez-Iñón, M.T.; Glikin, G.C. y Torres, H.N. (1982) Biochem. J. 203: 611.
182. Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 990.
183. Flawiá, M.M.; Terenzi, H.F. y Torres, H.N. (1977) Arch. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 334.
184. Torres, H.N.; Flawiá, M.M.; Terenzi, H.F. y Téllez-Iñón, M.T. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 67.
185. Terenzi, H.F.; Flawiá, M.M.; Téllez-Iñón, M.T. y Torres, H.N. (1976) J. Bacteriol. 126: 91.
186. Hoare, C.A. (1972) A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, pp.60.
187. Dvorak, J.A. (1976) Res. PAHO. Scienr. Publ. 318: 109.
188. Brener, Z. (1972) J. Protozool. 19: 23.
189. Gutteridge, W.E. y Coombs, G.H. (1977) Biochemistry of Parasitic Protozoa. The MacMillan Press Ltd., pp.152.
190. Da Silveira, J.F.; Zingales, B. y Colli, W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 481: 722.

191. Rangel-Aldao, R.; Tovar, G. y Ledesma de Ruiz, M. (1983) J.Biol.Chem. 258: 6979.
192. Goncalves, M.; Zingales, B. y Colli, W. (1980) Molec.Biochem.Parasit. 1: 107.
193. Nota, N.R.; Nejamkis, M.R. y Giovanniello, O.A. (1981) Bases de Inmunología, López Libreros Ed., pp.53.
194. Köhler, G. y Milstei, C. (1975) Nature 256: 495.
195. Zimmermann, U. (1982) Biochim.Biophys.Acta 694: 227.
196. Littlefield, J.W. (1964) Science 145: 709.
197. Emerson, S. (1963) Genetics 34: 162.
198. Vogel, H.J. (1956) Microbiol.Genet.Bull. 13: 42.
199. Woodward, V.W. y Woodward, C.K. (1968) Neurospora Newsletters 13: 18.
200. Segura, E.L.; Subias, E.; Esteva, M.; Cabeza Meckert, P.; Bronzina, A. y Laguens, R.P. (1980) Medicina, Buenos Aires 40 (Supl.1), 97.
201. Jerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Blanco, A.; Paulone, I. y Segura, E.L. (1976) Acta Physiol.Latinoam. 26: 10.
202. Flawiá, M.M. y Torres, H.N. (1972) J.Biol.Chem. 247: 6873.
203. Greenless, A.W. y Symons, R.H. (1966) Biochim.Biophys.Acta 119: 241.
204. Rodbell, M. (1967) J.Biol.Chem. 242: 5744.
205. Salomon, Y.; Londos, C. y Rodbell, M. (1974) Anal.Biochem 58: 541.
206. Bray, C. (1960) Anal.Biochem. 1: 279.
207. Cuatrecasas, P. (1970) J.Biol.Chem. 245: 3059.
208. Worthington Enzyme Manual (1972), Worthington Biochemical Corporation, pp.7.
209. Biochemical Information (1973), Boehringer Mannheim Corp., Mannheim, West Germany.
210. Terenzi, H.F.; Roselino, E. y Passeron, S. (1971) Eur.J.Biochem. 18: 342.
211. Clarke, S. (1975) J.Biol.Chem. 250: 5459.

212. Meunier, J.C.; Olsen, R.W. y Changeux, J.P. (1972) F.E.B.S. Lett. 24: 63.
213. Eldestein, S.J. y Schachaman, H.K. (1967) J.Biol.Chem. 242: 306.
214. Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) J.Biol.Chem. 236: 1372.
215. Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) Biochim.Biophys.Acta 112: 346.
216. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227: 680.
217. Oakley, B.R.; Kirsch, D.R. y Morris, N.K. (1980) Anal.Biochim. 105: 361.
218. Vauquelin, G.; Geynet, P.; Hanoune, J. y Strosberg, A.D. (1977) Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 74: 3710.
219. Caron, M.C. y Lefkowitz, R.J. (1976) J.Biol.Chem. 251: 2374.
220. Schramm, M. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76: 1174.
221. Kennett, R.H.; McKearn, T.J.; Betchtol, K.B. (Eds.) (1980) Monoclonal Antibodies pp.374, Plenum Press, New York.
222. Towbin, H.; Staephelin, T. y Gordon, J. (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76: 4350.
223. Heide, K. y Schwcs, H.G. (D.M.Weir, ed.) (1970) Handbook of Experimental Immunolog. 6-1, Blackwell, Oxford.
224. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J.Biol. Chem. 193: 285.
225. Rossomando, E.F. y Cutler, L.S. (1975) Exper.Cell.Res. 95: 67.
226. Makino, S.; Reynolds, J.A. y Tanford, C. (1973) J.Biol.Chem. 248: 4926.
227. Neer, E.J. (1974) J.Biol.Chem. 249: 6527.
228. Storm, D.R.; Field, S.O. y Ryan, J. (1976) J.Supramol.Structure 4: 221.
229. King, T.E. y Howard, R.L. (1962) J.Biol.Chem. 237: 1686.
230. Song, C.S.; Nisselbaum, J.S.; Tandler, B. y Bodansky, O. (1968) Biochim. Biophys.Acta 150: 300.
231. Dean, P.D. y Watson, D.H. (1979) J.Chrom. 165: 301.
232. Thompson, S.T.; Cass, K.H. y Stellwagen, E. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72: 669.



233. Wong, T.W. y Goldberg, A.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2529.
234. MacLennan, D.H. y Smoly, J.M. (1969) J. Biol. Chem. 243: 1589.
235. Neer, E.J. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1498.
236. Stengel, D. y Hanoune, J. (1981) J. Biol. Chem. 256: 5394.
237. Reig Macfa, J.A. (1982) Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.
238. Hebdon, G.M.; Le Vine III, H.; Sahyoun, N.E.; Schmitges, C.J. y Cuatrecasas, P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 120.
239. Bilezikian, J.P. y Aurbach, G.D. (1973) J. Biol. Chem. 248: 5577.
240. Pohl, S.L.; Birnbaumer, L. y Rodbell, M. (1971) J. Biol. Chem. 246: 1849.
241. Hoffmann, F.M. (1979) J. Biol. Chem. 254: 255.
242. Limbird, L.E.; Gill, D.M. y Lefkowitz, R.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 775.
243. Orly, J. y Schramm, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 4410.
244. Schramm, M.; Orly, J.; Eimerl, S. y Korner, M. (1977) Nature 268: 310.
245. Schwarzmeier, J.D. y Gilman, A.G. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3: 227.
246. Citri, Y. y Schramm, M. (1980) Nature 287: 297.
247. Hybridoma Techniques (1980) Cold Spring Harbor, New York.
248. Brandwein, H.; Lewicki, J. y Murad, F. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 2788.
249. Takai, K.; Kurashina, Y.; Suzuki-Hori, C.; Okamoto, H. y Hayaishi, O. (1974) J. Biol. Chem. 249: 1965.
250. Corin, R.E.; Ferriola, P. y Donner, D.B. (1982) J. Biol. Chem. 257: 1626.

ABREVIATURAS

1. ADP adenosina 5'-difosfato.
2. 5'-AMP adenosina 5'-monofosfato.
3. ATP adenosina 5'-trifosfato.
4. AMPc adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.
5. DEAE Dietilaminoetil.
6. DTT Ditiotreitól.
7. GDP Guanosina 5'-difosfato.
8. GMP Guanosina 5'-monofosfato.
9. GMPc Guanosina 3'-5' monofosfato cíclico.
10. Gpp(NH)p Guanil-5'-yl imido difosfato.
11. GTP Guanosina 5'-trifosfato.
12. HEPES N-2-hidroxietyl-piperazina-N'- 2 ácido etano sulfónico.
13. Ig Inmunoglobulina.
14. Me<sup>2+</sup> Cati3n divalente.
15. MIX Metilisobutilxantina.
16. MOPS N-3 morfolin-propano ácido sulf3nico.
17. NAD Nicotinamida adenina dinucle3tido.
18. PEG Polietilen glicol.
19. PEP Fosfoenol pir3vico.
20. Pi Ortofosfato libre.
21. PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
22. PPi Pirofosfato.
23. SDS Dodecil sulfato de sodio
24. TRIS 2-amino-2(hidroxiometil)-1,3 propanodiol.

**Publicación Impresa por  
Reprografías JMA S.A.  
SAN JOSE 1573  
Buenos Aires**